

AUS DEM INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSWISSENSCHAFTEN
DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA
LEHRSTUHL ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGIE



seit 1558

Cis-9,trans-11-konjugierte Linolsäure
hemmt entzündliche Prozesse
in Asthmamodellen *in vitro* und *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Anke Magdalena Jaudszus

aus Mechterstädt

Jena, 2008

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerhard Jahreis

2. Prof. Dr. Stefan Lorkowski

3. Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Datum der Disputation:

26. Februar 2009

Meinen Eltern Annemarie und Dietmar

und allen Kindern der CLA-Studie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Asthma bronchiale	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Diagnose	2
1.1.3 Pathophysiologie	3
1.1.4 Immunologische Grundlagen	5
1.1.4.1 Allergische Sensibilisierung	5
1.1.4.2 Allergische Reaktion	7
1.1.5 Ursachen und Risikofaktoren	8
1.1.5.1 Genetik	8
1.1.5.2 Umweltfaktoren	8
1.1.5.3 Infektionen und die Hygiene-Hypothese	9
1.1.5.4 Die Diät-Hypothese	10
1.2 Konjugierte Linolsäuren (CLA)	12
1.2.1 Nomenklatur	12
1.2.2 Biosynthese und natürliches Vorkommen	12
1.2.3 Kommerzielle CLA-Synthese	14
1.2.3.1 Bakteriell	14
1.2.3.2 Chemisch	14
1.2.4 Physiologische Wirkungen	15
1.3 Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPARs)	19
1.3.1 Mitglieder der PPAR-Familie	19
1.3.2 Struktur	20
1.3.3 Kontrolle der Genexpression	20
1.3.4 PPARs und Atemwegsentzündung	22
1.3.5 CLA entfalten entzündungshemmende Wirkung via PPARs	23
2 Zielstellung	24
2.1 Hypothese	24
2.2 Spezielle Zielstellung	24
2.2.1 Teil I: Immunologie	24
2.2.1.1 In vitro-Modell	24
2.2.1.2 In vivo-Modell	25
2.2.2 Teil II: Metabolismus	25
3 Material und Methoden	26
In vitro-Modell	26
3.1 Zellbiologische Methoden	26
3.1.1 Stimulanzien und Inhibitoren	26
3.1.1.1 Fettsäuren	26
3.1.1.2 PPAR γ -Antagonist GW9662	26
3.1.1.3 Lipopolysaccharid	26
3.1.2 Die Zelllinie BEAS-2B	26
3.1.2.1 Kultivierung	26
3.1.2.2 Langzeitlagerung	27
3.1.3 Stimulation der BEAS-2B	28
3.1.4 Isolierung und Aufreinigung von Eosinophilen	28
3.1.5 Durchflusszytometrie	29
3.1.6 Co-Kultur von BEAS-2B und Eosinophilen	31

3.2	Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1	RNA Extraktion	31
3.2.1.1	Quantifizierung der RNA	31
3.2.1.2	Qualitätskontrolle	32
3.2.2	Reverse Transkription	32
3.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.1	ELISA zur Quantifizierung von IL-8	35
3.3.2	ELISA zur Quantifizierung von ECP	36
	In vivo-Modell	37
3.4	Futter	37
3.4.1	Supplementierte CLA-Öle	37
3.4.2	Fütterungsregime	38
3.4.2.1	Primäre Prävention von allergischer Atemwegsentszündung	39
3.4.2.2	Sekundäre Prävention von allergischer Atemwegsentszündung	39
3.4.2.3	Akkumulation und Metabolisierung von CLA	39
3.5	Immunisierung und Induktion von Atemwegsentszündung	40
3.6	In vivo-Atemwegsreaktivität nach cholinergem Provokation	40
3.7	Zelldifferenzierung in der Bronchoalveolären Lavage (BAL)	42
3.8	Zellbiologische Methoden	42
3.8.1	Splenozytenproliferation	42
3.9	Molekularbiologische Methoden	43
3.9.1	Bestimmung der mRNA-Expression von PPAR γ	43
3.10	Proteinbiochemische Methoden	44
3.10.1	ELISA zur Bestimmung von IL-5 in der BAL	44
3.10.2	ELISA zur Bestimmung der Immunglobulin-Plasmatiter	45
3.11	Untersuchung der Organe	46
3.11.1	Histologie der Lungen	46
3.11.1.1	Periodsäure Schiff-Färbung	46
3.11.1.2	Histologische Beurteilung	47
3.11.2	Fettsäureanalytik	47
3.11.2.1	Lipidextraktion	47
3.11.2.2	Derivatisierung	48
3.11.2.3	Dünnschicht-Chromatographie	48
3.11.2.4	Gas-Chromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID)	49
3.12	Statistik	49
4	Ergebnisse	51
	Teil I - Immunologie	51
	In vitro-Modell	51
4.1	Effekte in BEAS-2B	51
4.1.1	IL-8 Produktion auf Proteinebene	51
4.1.2	IL-8-Produktion auf mRNA-Ebene	52
4.2	Effekte in Eosinophilen	53
4.2.1	Vitalität	53
4.2.2	CD69-Expression	54
4.2.3	CD13-Expression	54
4.3	ECP-Freisetzung in der Co-Kultur	55

<i>In vivo</i>-Modell	56
4.4 Akkumulation von <i>c9,t11</i> -CLA in der Lunge	56
4.5 Humorale Immunantwort	57
4.6 AR nach cholinenger Provokation	58
4.7 Atemwegsentszündung	60
4.7.1 Zelluläre Infiltration in die Lunge	60
4.7.2 IL-5 in der BAL	61
4.7.3 Histologische Veränderungen in der Lunge	62
4.8 PPAR γ -mRNA-Expression in der Lunge	64
4.9 Proliferation der Splenozyten	65
4.10 Eicosanoidpräkursorische Fettsäuren	66
Teil II - Metabolismus	69
4.11 Phänotypen	69
4.11.1 Körpergewicht und Futterverbrauch	69
4.11.2 Körperfettverteilung	69
4.12 Fettsäureanalytik	70
4.12.1 Abdominales Fettgewebe	70
4.12.2 Leber	73
4.12.3 Erythrozyten	74
5 Diskussion	77
5.1 Effekte von <i>c9,t11</i> -CLA auf Entzündungsparameter <i>in vitro</i>	77
5.1.1 <i>c9,t11</i> -CLA hemmt die Bildung von IL-8 in BEAS-2B via PPAR γ	77
5.1.2 <i>c9,t11</i> -CLA hemmt die Aktivierung von Eosinophilen	81
5.2 Effekte der <i>c9,t11</i> -CLA-reichen Diät auf die Ausbildung von allergischer Atemwegsentszündung <i>in vivo</i>	83
5.2.1 <i>c9,t11</i> -CLA hemmt die allergische Sensibilisierung	83
5.2.2 <i>c9,t11</i> -CLA hemmt die allergische Atemwegsentszündung	85
5.2.2.1 Die Rolle von PPAR γ	85
5.2.2.2 Die Rolle der <i>n6</i> -PUFA	86
5.3 Metabolische Wirkungen der PPAR-Aktivierung	87
5.3.1 Beispiele für PPAR-Liganden und ihre funktionellen Rollen	87
5.3.2 Metabolische Wirkungen von 9,11-Isomeren der CLA	89
5.3.3 Effekte von <i>t10,c12</i> -CLA im Fettstoffwechsel	90
5.4 Methodische Kritik	94
5.4.1 Co-Kultur	94
5.4.2 Gaschromatographische Trennung der Fettsäuren einschließlich der CLA	95
5.4.3 Olivenöl als Kontrollöl	95
5.5 Andere immunmodulatorische Milch Inhaltsstoffe	96
5.6 Ausblick auf Anwendbarkeit	98
6 Zusammenfassung	99
7 Summary	102
8 Literaturverzeichnis	104
9 Anhang	133
9.1 Effekte von GW9662 in der Negativkontrolle	133
9.2 Detektion von <i>trans</i> -C18:1 in der Leber nach 39-tägiger CLA-Mix-Diät	134
9.3 Analyse der Phospholipide des abdominalen Fettgewebes	136

9.4	Inkorporation von <i>c9,t11</i>-CLA in BEAS-2B nach 24 h	137
9.5	Detektion von <i>t7,c9</i>- und <i>t8,c10</i>-CLA im <i>c9,t11</i>-CLA-Peak	138
9.5.1	Supplementiertes Öl: <i>c9,t11</i> -CLA-reiches Triazylglyzerol	138
9.5.2	Supplementiertes Öl: CLA-Mix Triazylglyzerol	141
9.6	Fettsäurenverteilung nach olivenölreicher Diät	143
9.7	Erklärung	144
9.8	Danksagung	145
9.9	Publikationen und Kongressbeiträge	147
9.10	Lebenslauf	149

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure, engl. arachidonic acid, C20:4n6
ABCA1	engl. ATP-binding cassette A1
Ag ⁺ -HPLC	engl. high-performance liquid chromatography, Silberionen-imprägniert
AHR	Atemwegshyperreaktivität
Ak	Antikörper
AMPK	Adenosinmonophosphat-Kinase
APC	antigenpräsentierende Zelle
Apo	Apolipoprotein
Aqua dest.	destilliertes/demineralisiertes Wasser
AR	Atemwegsreaktivität
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALB/c	Mausstamm
BEAS-2B	humane bronchiale Epithelzelllinie
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, engl. bovine serum albumin
<i>c9,t11</i> -CLA	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-Octadecadiensäure, C18:2 <i>c9,t11</i>
CD	Zelloberflächenmarker, engl. cluster of differentiation
CLA	konjugierte Linolsäure, engl. conjugated linoleic acid
CRP	C-reaktives Protein
DBU	1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFC	2,7-Dichlorfluoreszein
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	doppelsträngige Desoxynukleosid-Triphosphate
ECP	eosinophiles kationisches Protein
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	engl. enzyme linked immunosorbent assay
Eo	eosinophiler Granulozyt
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FATP	engl. fatty acid transport protein
FFS	freie Fettsäure
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FS	Fettsäure
GLUT-4	Glukosetransporter-4
GW9662	2-Chloro-5-nitro- <i>N</i> -phenylbenzamid, selektiver PPAR γ -Inhibitor
h	Stunde, engl. hour
HBSS	HEPES Buffered Saline Solution
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVC	engl. isolated ventilation cage
kBq	Kilobecquerel

LA	Linolsäure, engl. linoleic acid, C18:2c9,12, C18:2n6
LA-4	murine bronchiale Epithelzelllinie
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
MACS	magnetic assisted cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mch	Metacholin (Acetyl- β -Methylcholin-Chlorid)
min	Minute
MNC	Mononukleäre Zellen
MW	engl. molecular weight
NFAT	engl. nuclear factor of activated T cells
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, engl. phosphate-buffered saline
P _{enh}	engl. enhanced pause
PG	Prostaglandin
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI ₃	Phosphatidylinositol-3
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure, engl. polyunsaturated fatty acid
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RTqPCR	engl. real time quantitative polymerase chain reaction
s	Sekunde
sdLDL	engl. small dense low-density lipoprotein
SEM	Standardfehler des Mittelwertes, engl. standard error of the mean
SOCS	engl. suppressor of cytokine signaling
SREBP	engl. sterol regulatory element binding protein
Sulfo-NHS- LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-[Biotin-Amido]Hexanoat
TAG	Triacylglycerol
TBE	Tris-Borat-EDTA
Th	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TMG	1,1,3,3-Tetramethylguanidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
U	engl. unit
UV	ultraviolett
v/v	engl. volume per volume
WBp	Ganzkörperplethysmographie, engl. whole body plethysmography
w/w	engl. weight per weight
Δ	delta
Σ	Summe

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Asthmaprävalenz bei 13-14-jährigen Jugendlichen	S. 2
Abb. 2	Lungenfunktionsparameter	S. 3
Abb. 3	Pathomechanismus einer IgE-vermittelten allergischen Entzündungsreaktion	S. 6
Abb. 4	Stereoisomeren konjugierter Diene	S. 12
Abb. 5	Biosynthese von CLA im Wiederkäuerpansen und endogene Synthese aus Vaccensäure	S. 13
Abb. 6	Schematische Struktur der PPARs	S. 20
Abb. 7	PPARs als Transkriptionsfaktoren	S. 21
Abb. 8	Schema der PPAR-vermittelten Entzündungshemmung	S. 21
Abb. 9	Überlegung zum Versuchsaufbau der <i>in vitro</i> -Studie	S. 24
Abb. 10	Konfluente BEAS-2B	S. 27
Abb. 11	Schichtung der Blutbestandteile nach Dichtegradienten-Zentrifugation	S. 28
Abb. 12	Repräsentatives Elektropherogramm einer intakten RNA	S. 32
Abb. 13	Isomerenverteilung der CLA-Präparate	S. 38
Abb. 14	Immunisierungs- und Fütterungsschemata der Primären und Sekundären Präventionsmodelle	S. 41
Abb. 15	IL-8-Sezernierung in BEAS-2B	S. 51
Abb. 16	IL-8-mRNA-Expression in BEAS-2B	S. 52
Abb. 17	Vitalität der Eosinophilen	S. 53
Abb. 18	Expression von CD69 auf Eosinophilen	S. 54
Abb. 19	Expression von CD13 auf Eosinophilen	S. 55
Abb. 20	ECP-Freisetzung in der Co-Kultur von BEAS-2B und Eosinophilen	S. 55
Abb. 21	Peakflächen von <i>c9,t11</i> -CLA in der murinen Lunge	S. 56
Abb. 22	Immunglobulin-Plasmatiter	S. 57
Abb. 23	<i>In vivo</i> -Messung der AR nach cholinерger Provokation	S. 59
Abb. 24	Differenzielle Zellzahlbestimmung in der BAL	S. 61
Abb. 25	IL-5 in der BAL	S. 62
Abb. 26	Histopathologische Veränderungen in der Lunge	S. 63
Abb. 27	PPAR γ -mRNA-Expression in der Lunge	S. 65
Abb. 28	Proliferation der Splenozyten nach Allergenstimulation	S. 66

Abb. 29	Gewebekonzentrationen von <i>c9,t11</i> -CLA, C20:4n6 (AA) und der Gesamt-n6- und -n3-PUFA	S. 67
Abb. 30	Entwicklung des Körpergewichtes und mittlerer täglicher Futterverbrauch während der 39-tägigen Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten	S. 69
Abb. 31	Phänotypische Veränderungen in der Körperfettverteilung nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA Diäten	S. 70
Abb. 32	Verhältnisse der Fettsäurenfraktionen im abdominalen Fettgewebe, der Leber und den Erythrozyten nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten	S. 71
Abb. 33	Zusammenhang zwischen der Anreicherung von <i>c9,t11</i> -CLA und der n6:n3-PUFA-Ratio in den Lipiden der Erythrozyten nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten	S. 76
Abb. 34	LPS-induzierte Aktivierung von Epithelzellen	S. 78
Abb. 35	Molekülstrukturen von LA und <i>c9,t11</i> -CLA	S. 79
Abb. 36	Metabolische Effekte von PPAR-Agonisten	S. 88
Abb. A1	Peakflächen der C18:1 <i>trans</i> -Isomeren in der murinen Leber nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten	S. 135
Abb. A2	Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide und der Phospholipide des abdominalen Fettgewebes nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten	S. 136
Abb. A3	Konzentration von <i>c9,t11</i> -CLA in BEAS-2B nach 24 h Inkubation mit 10 µg/ml der FFS	S. 137
Abb. A4	Peakflächen der CLA-Isomeren im <i>c9,t11</i> -CLA-reichen TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer <i>c9,t11</i> -CLA-reichen Diät	S. 140
Abb. A5	Peakflächen der CLA-Isomeren im CLA-Mix TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer CLA-Mix-reichen Diät	S. 142

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mediatoren beim Asthma bronchiale	S. 4/5
Tabelle 2	Isomerenspezifische Effekte von CLA am Beispiel von Karzinogenese	S. 17
Tabelle 3	Isomerenspezifische Effekte von CLA am Beispiel von Inflammation und zellulärem Stress	S. 18
Tabelle 4	Gebräuchliche Fluoreszenzfarbstoffe	S. 29
Tabelle 5	Verwendete Primerpaare zur Amplifikation von IL-8	S. 34
Tabelle 6	Fettsäurenzusammensetzung der CLA-Präparate	S. 37
Tabelle 7	Fettsäurenzusammensetzung der Versuchsdäten	S. 38
Tabelle 8	PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von PPAR γ	S. 43
Tabelle 9	Verwendete Primer und Sonden zur Amplifikation von PPAR γ	S. 44
Tabelle 10	Temperaturprogramm zur Amplifikation von PPAR γ	S. 44
Tabelle 11	Semiquantitativer PAS-Score	S. 47
Tabelle 12	Fettsäurenspektrum des abdominalen Fettgewebes nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Däten	S. 72
Tabelle 13	Fettsäurenspektrum der Lebern nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Däten	S. 74
Tabelle 14	Fettsäurenspektrum der Erythrozyten nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Däten	S. 75
Tabelle 15	Beispiele für PPAR-Liganden	S. 80
Tabelle Zusammenfassung	Effekte von <i>c9,t11</i> -CLA auf immunologische Parameter	S. 100
Tabelle A1	Effekte der Coadministration von GW9662 in der Negativkontrolle	S. 133
Tabelle A2	C18:1 <i>trans</i> -Isomeren in der Leber nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Däten	S. 134
Tabelle A3	Verteilung der CLA-Isomeren im <i>c9,t11</i> -CLA-reichen TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer <i>c9,t11</i> -CLA-reichen Diät	S. 139
Tabelle A4	Verteilung der CLA-Isomeren im CLA-Mix TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer CLA-Mix-reichen Diät	S. 141
Tabelle A5	Fettsäurenverteilung in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer olivenölreichen Diät	S. 143

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist die Häufigkeit allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale dramatisch angestiegen. Ziel der Allergieforschung ist, Präventions- und Therapiestrategien zu entwickeln, um diesem alarmierenden Trend entgegen zu wirken. Dabei ist das wachsende Verständnis für die Ursachen und die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen von essentieller Bedeutung. Jüngsten Erkenntnissen zufolge kann der tägliche Verzehr von Milch und Wiederkäuerprodukten seit früher Kindheit vor der Entstehung eines allergischen Asthma bronchiale schützen. MilCHFett ist die natürliche Hauptquelle von *cis-9,trans-11-CLA*. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob *c9,t11-CLA* durch eine entzündungshemmende Wirkung zu diesem präventiven Effekt beiträgt.

1.1 Asthma bronchiale

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Asthma bronchiale ist als anfallsweise akute Atemnot auf der Grundlage einer generalisierten reversiblen Obstruktion der chronisch-entzündlichen und hyperreagiblen Atemwege definiert. Je nach Rezidivierungsfrequenz wird die Erkrankung nach WHO-GINA-Richtlinien in vier klinische Schweregrade eingeteilt: intermittierendes leichtes, persistierend mildes, persistierend mittelschweres und persistierend schweres Asthma (Global Initiative for Asthma 1995). Ätiologisch unterscheidet man zwischen allergischem (extrinsischem) und nicht-allergischem (intrinsischem) Asthma sowie chemisch- oder physikalisch-irritativen und anstrengungsinduzierten Mischformen. Abhängig von der individuellen genetischen Prädisposition (Heinzmann & Deichmann 2001) und dem Einfluss von Umweltfaktoren (Sharma *et al.* 2007) ist die extrinsisch-atopische (IgE-vermittelte) Genese des Asthmas am häufigsten (Romanet-Manent *et al.* 2002). Die Annahme einer kausalen Beziehung zwischen einem relativ hohen sozioökonomischen Standard und der steigenden Prävalenz und Inzidenz allergischer Erkrankungen in westlichen Industrieländern (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee 1998; Abb. 1) wird durch epidemiologische Beobachtungen aus dem wiedervereinten Deutschland gestützt. Hier stiegen die vergleichsweise niedrigen Prävalenzen für allergisches Asthma und Rhinitis in den neuen Bundesländern im Laufe der Anpassung an westliche Lebensverhältnisse und die damit verbundenen Veränderungen der Ernährungsweise in wenigen Jahren signifikant an (von Mutius *et al.* 1998, Heinrich *et al.* 2002, Krämer

et al. 2002). Mit einer Prävalenz von etwa 10 % ist Asthma bronchiale in Deutschland das häufigste chronisch-entzündliche Leiden im Kindesalter (Maziak *et al.* 2003).

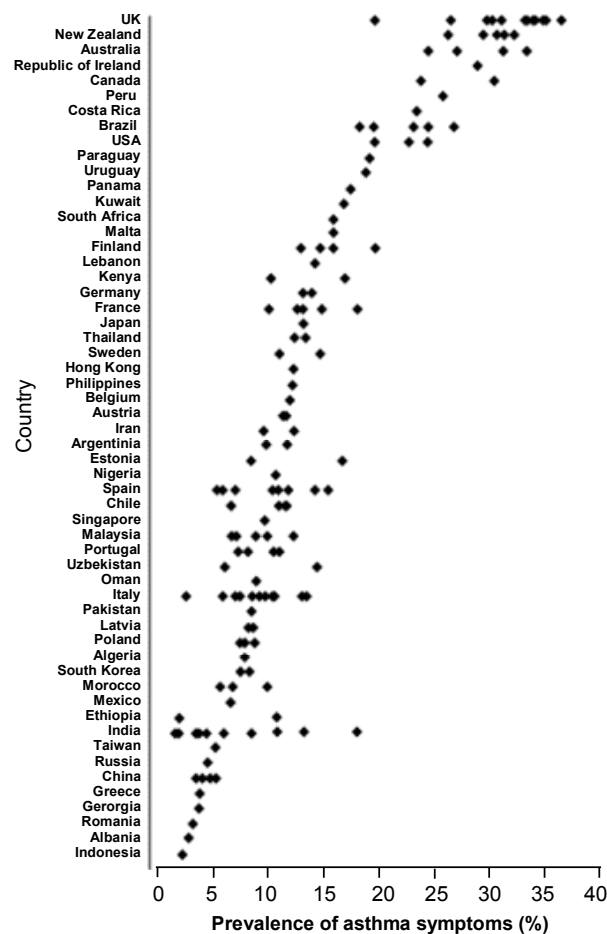
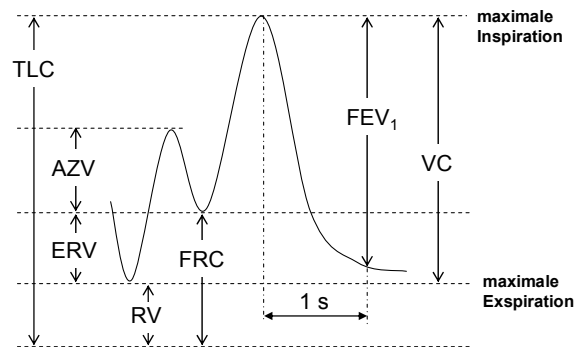


Abb. 1: Asthmaprävalenz bei 13-14-jährigen Jugendlichen. Multizentrische Ein-Jahres-Erhebung Ende der 90er Jahre im Rahmen der ISAAC Studie. Aus *Lancet* 351: 1225-32, 1998

1.1.2 Diagnose

Zunächst erfolgt in einer Anamnese die diagnosesnahe Zuordnung der typischen Symptome und gegebenenfalls die Abklärung der allergischen Diathese. Die gesicherte Diagnose wird durch die Prüfung der Lungenfunktion gestellt (Deutsche Atemwegsliga e.V. 2005). Mithilfe von diagnostischen Verfahren wie der Spirometrie (»kleine Lungenfunktion«) werden auf dem Nachweis einer reversiblen Atemwegsobstruktion basierend statische und dynamische Lungenparameter ermittelt (Abb. 2). Der Quotient aus dem maximal ventilierbaren Volumen (VC) und dem in einer Sekunde bei forcierter Expiration ausgeatmeten Volumen (FEV₁) bezeichnet den Tiffeneau-Index (nach Robert Tiffeneau, 1910-1961), der als Maß der obstruktiven Lungenfunktionsstörung herangezogen wird. Ein weiterer empfindlicher Parameter für die zentrale Atemwegsobstruktion ist der Strömungswiderstand in den

FEV₁ - Ein-Sekundenkapazität

Typischerweise manifestiert sich das allergische Asthma bronchiale zwischen dem 3. und 10. Lebensjahr nach spezifischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene, z.B. aus Pollen oder Milbenexkrement, wobei meist eine remittierende Nahrungsmittelallergie vorausgegangen ist (Wahn 2000, Høst *et al.* 2002). Die Reexposition mit dem Allergen führt zu einer heftigen IgE-vermittelten Sofortreaktion (early asthmatic reaction, EAR), deren klinische Symptome sich in Minuten entwickeln. Neben ödematöser Schleimhautschwellung und Hypersekretion eines zähen Schleims führt anhaltende Atemwegsobstruktion zu akuter Atemnot. Nach allmählichem Abklingen folgt meist nach 3-6 Stunden eine zweite Welle des Bronchospasmus (late asthmatic reaction, LAR). Die intensive lokale Reaktion entwickelt sich in einem Netzwerk von Interaktionen zwischen nervösem, vaskulärem und Muskelgewebe und benachbarten oder infiltrierten Effektorzellen, insbesondere Mastzellen, Eosinophilen, Lymphozyten, Neutrophilen und Epithelzellen. Dabei wird eine Reihe von Entzündungsmediatoren gebildet wie Zytokine, Chemokine, Lipidmediatoren, Wachstumsfaktoren und Neuropeptide (Tab. 1). Freigesetzt aus den Speichergranula der chemotaktisch angelockten inflammatorischen Zellen oder *de novo* produziert tragen sie in para- oder autokriner Weise zur Entzündung der Atemwege bei. Diese ist letztlich Grundlage für die funktionellen (Obstruktion, AHR) und später bei Chronifizierung der Erkrankung auch strukturellen Veränderungen (remodeling) in den Atemwegen.

Tabelle 1: Mediatoren beim Asthma bronchiale.

Mediatoren	Beispiele	Herkunft (hauptsächlich)	Wirkung / strukturelle Veränderungen	Referenz
Präformiert (Speichergranula)				
Enzyme	Tryptase, Chymase	Mastzellen, Basophile	Airway remodeling	Sommerhoff & Schaschke 2007 Zanini <i>et al.</i> 2007
	MMP-9	Neutrophile		Takafuji <i>et al.</i> 2003
	EPO	Eosinophile	erhöhtes IgE	Krug <i>et al.</i> 1999
Toxische Proteine	Histamin	Mastzellen	Bronchokonstriktion	Bradding <i>et al.</i> 2006
	ECP	Eosinophile	zyto- und neurotoxisch	Erjefält <i>et al.</i> 1999
	MBP	Eosinophile	AHR	Verbout <i>et al.</i> 2007
Lipidmediatoren				
COX- Produkte	PGD ₂ , F _{2α}	viele Zellen	Bronchokonstriktion	Park & Christman 2006
	PGE ₂		Bronchodilatation, Schleimsekretion	
	TxA ₂		Vasodilatation, Ödembildung	
LOX- Produkte	LTC ₄ , D ₄ , E ₄	Mastzellen, Basophile, Epithelzellen	Bronchokonstriktion, Verstärkung der Schleimsekretion	McMillan 2001
	LTB ₄		Chemotaxis von Leukozyten	
	PAF	viele Zellen	verstärkt Produktion von Lipidmediatoren, Chemotaxis von Leukozyten, Erhöhung der AHR	Uhlig <i>et al.</i> 2005
De novo synthetisiert				
Zytokine	IL-3	Th1 und Th2, Mastzellen, Eosinophile	Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen, Neutrophilen und Basophilen	Yoshimura <i>et al.</i> 2002 Asquith <i>et al.</i> 2008
	IL-4	Th2, Mastzellen	Differenzierung und Aktivierung von Th2, IgE-Isotypenwechsel in B-Zellen, induziert Expression von Adhäsionsmolekülen	Swain <i>et al.</i> 1990 Geha <i>et al.</i> 2003 Schleimer <i>et al.</i> 1992
	IL-5	Th2, Mastzellen, Eosinophile	Wachstum, Reifung, Aktivierung, Chemotaxis von Eosinophilen	Hamelmann & Gelfand 2001 Asquith <i>et al.</i> 2008
	IL-6	DC, Makrophagen, Epithelzellen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von Th2, unterstützt Proliferation von B- Zellen	Doganci <i>et al.</i> 2005
	IL-9	Th2, Epithelzellen	verstärkende Wirkung auf Mastzellen, stimuliert Th2-Zellen, unterstützt IL-13	McNamara & Smyth 2005 Temann <i>et al.</i> 2007
	IL-13	Th2, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, unterstützt IL-4, Verstärkung der Schleimsekretion	Geha <i>et al.</i> 2003 Kupermann <i>et al.</i> 2002 Bradding <i>et al.</i> 2006
	GM-CSF	T-Zellen, MNC	Wachstum und Differenzierung von Monozyten und Dendritischen Zellen, Überleben von Eosinophilen	Vodyanik & Slukvin 2007 Park <i>et al.</i> 1998

Fortsetzung **Tabelle 1:** Mediatoren beim Asthma bronchiale.

Mediatoren	Beispiele	Herkunft (hauptsächlich)	Wirkung / strukturelle Veränderungen	Referenz
De novo synthetisiert				
Chemokine	IL-8	Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten	mobilisiert, aktiviert und degranuliert Neutrophile, Eosinophile und Mastzellen, mobilisiert naive T-Zellen	Yoshihara <i>et al.</i> 2006 Shute 1994 Larsen <i>et al.</i> 1989 Gerszten <i>et al.</i> 1999
	RANTES	Epithelzellen, MNC	mobilisiert, aktiviert und degranuliert Basophile und Eosinophile, stimuliert Th2-Immunität	Matsubara <i>et al.</i> 2006 Oyamada <i>et al.</i> 2006
	Eotaxin	Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, T-Zellen	Chemotaxis und Aktivierung von Eosinophilen	Honda & Chihara 1999
	MCP-1	Makrophagen, Fibroblasten	Chemotaxis von Th2-Zellen, Monozyten und Basophilen	Alam <i>et al.</i> 1996

Abkürzungen: COX · Cyclooxygenase, EPO · Eosinophil Peroxidase, GM-CSF · Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, LOX · Lipoxygenase, LT · Leukotriene, MBP · Major Basic Protein, MCP-1 · Monocyte Chemoattractant Protein-1, MMP-9 · Matrix Metalloproteinase, PG · Prostaglandin, RANTES · Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted

1.1.4 Immunologische Grundlagen

1.1.4.1 Allergische Sensibilisierung

Am Anfang der Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale steht die allergische Sensibilisierung (Abb. 3). Voraussetzung für diese Th2-vermittelte Immunreaktion ist, dass inhalative Allergene durch intraepitheliale antigenpräsentierende Zellen (APC) z.B. Dendritische Zellen oder Alveolar-Makrophagen, erkannt und phagozytisch oder makropinozytisch abgefangen werden. Die Aufnahme des Allergens aktiviert die APC zur gerichteten Wanderung in benachbarte drainierende Lymphknoten, wo sie ihre hoch spezialisierte Funktion erfüllen, naiven T-Zellen prozessierte (proteolytisch gespaltene) Peptide des Allergens zu präsentieren. Nun wird die adaptive Immunantwort eingeleitet, die schließlich zur Bildung allergenspezifischer Antikörper führt. Während ihrer Wanderung verlieren die APC ihre Fähigkeit zur Phagozytose (Sallusto *et al.* 1995) und exprimieren große Mengen von langlebigen Glykoproteinen, den sog. MHC-II-Molekülen, auf ihrer Oberfläche (Cella *et al.* 1997). MHC-II binden das allergene Peptid und werden über Interaktion mit dem passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) von noch undifferenzierten CD4⁺ T-Zellen (Th0) erkannt (erstes Signal). Zur vollständigen Differenzierung zu Th2-Zellen und antigenspezifischen klonalen Vermehrung ist ein zweites costimulierendes Signal nötig. Dieses wird über die Bindung von B7-Molekülen an T-zelluläres CD28 (van Rijn *et al.* 2004) sowie durch Interaktion von dendritischem Jagged-1 und Notch, einem

hochkonservierten Rezeptor auf T-Zellen, vermittelt (Liotta *et al.* 2008). In Gegenwart von IL-4, das nach Induktion des Transkriptionsfaktors GATA-3 frühzeitig durch eine kleine Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen sezerniert wird, erfolgt die Reifung zu T-Zellen des Th2-Typs (Amsen *et al.* 2004).

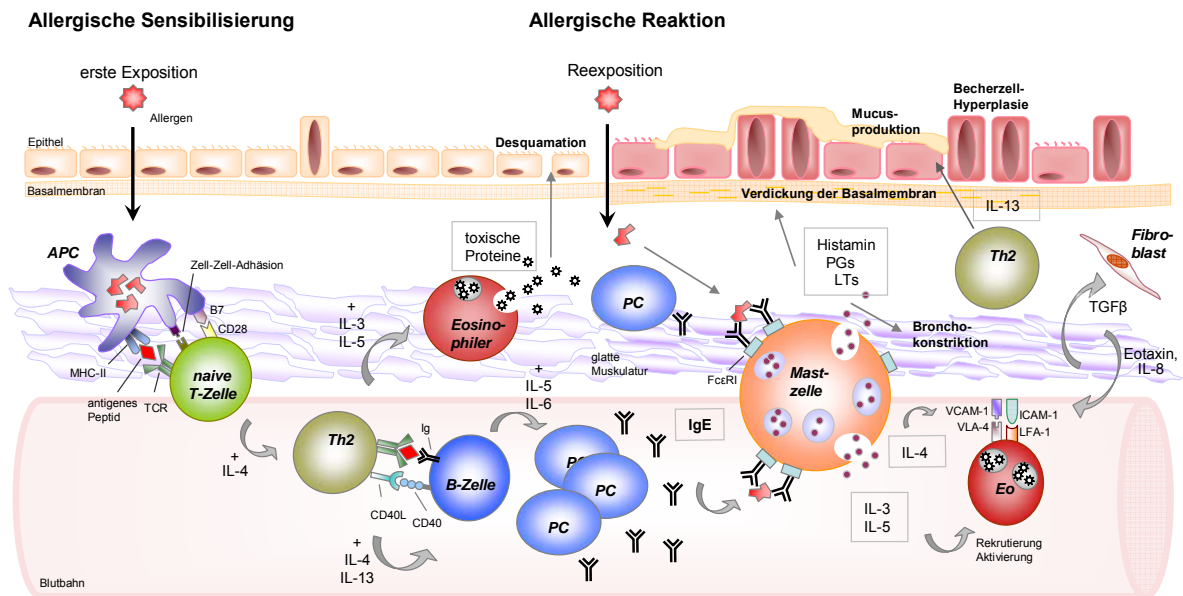


Abb. 3: Pathomechanismus einer IgE-vermittelten allergischen Entzündungsreaktion.

Abkürzungen: APC · Antigen Presenting Cell, ICAM-1 · Intercellular Adhesion Molecule-1, Eo · Eosinophils, LFA-1 · Leukocyte Function associated Antigen-1, LT · Leukotriene, MHC-II · Major Histocompatibility Complex-II, PC · Plasma Cell, PG · Prostaglandin, TCR · T-Cell Receptor, VCAM-1 · Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VLA-4 · Very Late Antigen-4

Th2-Zellen selbst produzieren durch erhöhte Transaktivierungsaktivität von GATA-3 und STAT6 große Mengen IL-4, was einerseits die Expansion der Th2- auf Kosten der Th1-Zell-Population begünstigt (Swain *et al.* 1990) und andererseits in allergenspezifischen B-Zellen den Isotypenwechsel von konstitutiv exprimiertem IgM zur IgE-Produktion auslöst (Geha *et al.* 2003). Hierbei wird zunächst durch Bindung von IL-4 oder IL-13 an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche der B-Zellen die intrazelluläre Signalleitung über Janus-Tyrosinkinasen (JAK1 und 3) induziert, in deren Verlauf der Transkriptionsfaktor STAT6 aktiviert wird (Keegan *et al.* 1995, Wick *et al.* 2000). Der transloziert daraufhin in den Zellkern und leitet die Genexpression der dem Isotyp E entsprechend rekombinierten funktionellen Domänen des Antikörpers ein. Zur vollständigen Synthese des IgE bedarf es eines zweiten Signals, nämlich des direkten Zell-Zell-Kontaktes, vermittelt durch das B-Zell-Oberflächenmolekül CD40 und den passenden T-Zell-Liganden CD40L (Iciek *et al.* 1997). Unterstützt durch IL-3, IL-5, IL-6 und IL-7 proliferieren die B-Zellen und differenzieren zu Plasmazellen, die große Mengen an IgE

produzieren (Van Cauwenberge 1997, Erickson *et al.* 2001). Bei Allergikern tragen auch mukosale B- und Plasmazellen zur IgE-Synthese bei (KleinJan *et al.* 2000).

1.1.4.2 Allergische Reaktion

Kommt es nun zur Reexposition mit dem Allergen wird in Kürze eine allergische Reaktion ausgelöst, an der maßgeblich subepitheliale Mastzellen beteiligt sind (Abb. 3). Ähnlich wie aktivierte Eosinophile (Capron *et al.* 1997) und Granulozyten (Suzukawa *et al.* 2005, Alphonse *et al.* 2008) im peripheren Blut tragen sie hochaffine Rezeptoren für IgE (FcεRI) auf ihrer Oberfläche (Pawankar & Ra 1998). Werden rezeptorgebundene IgE-Moleküle durch Bindung des Allergens quervernetzt (»bridging«), erfolgt innerhalb von Sekunden die Degranulierung und Freisetzung der gespeicherten chemischen Mediatoren wie Histamin, dem Vermittler der allergischen Sofortreaktion. Außerdem synthetisieren und sezernieren aktivierte Mastzellen bronchokonstriktorische Lipidmediatoren, Chemokine und verschiedene Zytokine wie IL-3, IL-4 und IL-5, welche die Th2-Reaktion aufrecht erhalten und den Zustrom und die Aktivierung von Leukozyten, vor allem der Eosinophilen, induzieren (Bradding *et al.* 2006). Die gerichtete Wanderung der Leukozyten aus dem Blut (Extravasation) hin zum Entzündungsherd (»homing«) basiert auf der spezifischen und regulierbaren Expression von Adhäsionsmolekülen auf leukozytärer und epithelialer Seite. Zunächst erscheinen die Selektine in Reaktion auf LTB₄ und PAF auf der Oberfläche der Endothelzellen, an die sich die zirkulierenden Leukozyten reversibel anheften und am Endothel sozusagen entlang rollen (Zimmerman *et al.* 1994). TNF-α induziert die Expression von ICAM-1 (CD54), ein mit den Immunglobulinen verwandtes Adhäsionsmolekül, das mit dem Leukozytenintegrin LFA-1 (CD11a/CD18) in Wechselwirkung tritt (Lo *et al.* 1992). Die Adhäsionskapazität wird dabei wesentlich durch IL-8 oder andere an Proteoglykane auf der Oberfläche des Endothels gebundene Chemokine erhöht (Gerszten *et al.* 1999). Mithilfe proteolytischer Enzyme und weiterer adhäsiver Wechselwirkungen durchtreten die Leukozyten das Endothel (Diapedese) und wandern entlang eines matrixassoziierten Konzentrationsgradienten von Chemokinen zum Wirkungsort, wo sie an der Reaktion der späten Phase und der Ausbildung einer chronischen Inflammation beteiligt sind.

1.1.5 Ursachen und Risikofaktoren

1.1.5.1 Genetik

Ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale ist die individuelle genetische Prädisposition für die atopische Immunitätslage, d.h. der genetisch determinierten Bereitschaft, auf Umweltantigene mit IgE-Bildung zu reagieren. Meist besteht hierfür eine positive Familienanamnese (Kuiper *et al.* 2006). Darüber hinaus ist für die präferentielle Entwicklung von Bronchialasthma eine endorganspezifische Vererbung wahrscheinlich, wobei der genetische Einfluss der Mutter überwiegt (Litonjua *et al.* 1998). Es ist eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert worden, deren Proteinprodukte eng in die Pathophysiologie der Erkrankung involviert sind und deren genetische Variation (Polymorphismus) bei der Genese des allergischen Phänotyps eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Für die Chromosomenregion 5q31-33 wurden beispielsweise Polymorphismen der Gene, die für die Th2-Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 kodieren, beschrieben (Heinzmann & Deichmann 2001, Renauld 2001). Auch gibt es Hinweise auf eine Kopplung von Atopie im Speziellen mit Veränderungen von Genloci auf den Chromosomen 7 (Xu *et al.* 2000) und 11 (Rigoli *et al.* 2000).

1.1.5.2 Umweltfaktoren

Da sich der genetische Pool innerhalb von 2-3 Generationen nicht grundlegend ändert, ist es allerdings eher unwahrscheinlich, dass genetische Variationen hauptursächlich für den deutlichen Anstieg der Allergieprävalenz sind. Vielmehr geht man davon aus, dass die Entwicklung von Bronchialasthma ein multifaktorielles Geschehen ist, bei dem gleichfalls veränderte Umweltbedingungen ein verantwortlicher Faktor zu sein scheinen (Marks 2006). Heute wird postuliert, dass mit steigender Expositionsdauer und Konzentration von Innenraumallergenen, z.B. Hausstaubmilbenexkrement, Katzenhaare oder Schimmelpilze, die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung und damit die Suszeptibilität für allergisches Asthma steigt (Engvall *et al.* 2001, Kim JL *et al.* 2005, Celedón *et al.* 2007). Entsprechend wird als primärpräventive Maßnahme Allergenkenz empfohlen (Halken 2004). Inwieweit neben aerogenen Allergenen andere Luftschadstoffe mit der Asthmagenese in Verbindung gebracht werden können, ist noch unklar. Gesichert ist jedoch, dass eine erhöhte Belastung mit Luftschadstoffen zur klinischen Verschlechterung der Erkrankung führt. Permanente Tabakrauchexposition im häuslichen Umfeld z.B. wurde eindeutig mit verstärkter Exazerbation von bestehendem Asthma assoziiert (Carlsen *et al.* 2005). Allerdings scheint schon *in utero*-Exposition mit Tabakrauch ein Risikofaktor für kindliches Asthma zu sein

(Gilliland *et al.* 2001). Andere Studien haben den Einfluss von Chemikalien und chemischen Produkten auf die Ausbildung von Bronchialasthma fokussiert. In einer großangelegten Studie in Schweden konnte zwischen dem verstärkten Auftreten asthmatischer Symptome von Schulkindern und der Belastung der Klassenräume mit organischen Lösungsmitteln (z.B. 2-Methyl-1-Butanol) ein deutlicher Zusammenhang hergestellt werden (Kim *et al.* 2007). Ebenso wurden Asthmasymptome mit in PVC-Fußbodenbelägen enthaltenen Phthalatestern (Bornehag *et al.* 2004) oder mit chemischen Weichmachern wie z.B. TMPD-DIB (2,2,4-Trimethyl-1,3-pentandioldiisobutytrat) in Verbindung gebracht, die für die Herstellung von Wandfarben oder Plastik verwendet werden (Wieslander *et al.* 1997, Kim *et al.* 2007).

1.1.5.3 Infektionen und die Hygiene-Hypothese

Die Bedeutung von Pathogenen für die Initiation eines Asthma bronchiale ist vielfältig und nicht vollständig geklärt. Einerseits können frühkindliche Infektionen der oberen und unteren Luftwege, z.B. mit dem Rhinovirus (RSV, Respiratory Syncytial Virus), als Auslöser von akuter Atemwegsobstruktion wesentlich an der Manifestation eines Bronchialasthma beteiligt sein (Johnston 1995, Khetsuriani *et al.* 2007). Andererseits gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass eine frühe Immunstimulation durch bakterielle oder virale Infektionen einen protektiven Effekt auf die spätere Entwicklung allergischer Erkrankungen ausübt. Entsprechend wurde die deutlich niedrigere Asthmaprävalenz in kinderreichen Familien mit der erhöhten Infektionswahrscheinlichkeit durch die Geschwister oder Gleichaltrige in Kindertagesstätten interpretiert (Ball *et al.* 2000, Karmaus & Botezan 2002). Aus der Beobachtung heraus, dass die mit steigendem Lebensstandard (kleinere Familien, verbesserte Hygienebedingungen, städtisches Leben) sinkende Infektionslast die Entstehung von allergischen Erkrankungen begünstigt, wurde die Hygiene-Hypothese formuliert (Strachan 1989). Diese besagt, dass ein sich noch entwickelndes Immunsystem durch den Kontakt mit unterschiedlichsten exogenen Stimuli in eine »nicht-allergene« Richtung gelenkt wird, wozu frühkindliche Infektionen beitragen. Umgekehrt lässt sich jedoch nicht ableiten, auf Schutzimpfungen zu verzichten. Im Gegenteil, man nimmt an, dass sich eine Vakzination im ersten Lebensjahr präventiv auf die spätere Asthmagenese auswirkt (Martignon *et al.* 2005). Dieser Annahme wie auch der Hygiene-Hypothese werden Erkenntnisse zur Immunfunktion bei gesunden und atopischen Neugeborenen zugrundegelegt. So überwiegt bei allen Neugeborenen ein allergieprädisponierendes Th2-Zytokinmilieu, das das Ungeborene im Uterus vor Abstoßungsreaktionen der Mutter schützt (Levy O 2007). Bei nicht-allergischen

Kindern verschiebt sich dieses Zytokinmilieu im Laufe der ersten Lebensjahre in Richtung eines Th1-dominierten Milieus. Zytokine des Th1-Typs wie IFN γ oder IL-12 spielen bei akuten proinflammatorischen Zuständen eine Rolle, z.B. im Rahmen einer Infektion oder durch Endotoxinexposition, indem sie phagozytische und antibakterielle Mechanismen der zellvermittelten Immunität stimulieren (Mosmann & Coffman 1989). Bei später allergischen Kindern bleibt u.a. infolge der fehlenden exogenen Immunstimulation die Th2-Immunitätslage bestehen.

1.1.5.4 Die Diät-Hypothese

Wachsendes Forschungsinteresse richtet sich darauf, inwieweit das Risiko für allergische Erkrankungen von den Ernährungsgewohnheiten, insbesondere der Wahl der Öle und Fette, beeinflusst wird. Grundlegende Erkenntnisse in der Allergie- und Asthmaforschung erhärten die Hypothese, dass verschiedene PUFA-Klassen die entzündlichen Prozesse im Körper fördern oder hemmen können. Die Diät-Hypothese verbindet die pathophysiologischen Wirkungen bestimmter Eicosanoide mit der Tatsache, dass in entwickelten Ländern einerseits der Verzehr an n6-PUFA wie Linolsäure (C18:2n6, LA), andererseits die Asthmaprävalenz gestiegen ist (Hodge *et al.* 1994, Black & Sharpe 1997, Black 1999, Harbige 2003, Mickleborough & Rundell 2005). Gleichzeitig ist der Konsum von n3-PUFA z.B. aus Fischölen gesunken, der in verschiedenen Studien mit einem niedrigeren Risiko für die Erkrankung an Asthma assoziiert wurde (Nagakura *et al.* 2000, Mickleborough *et al.* 2006). Bereits während der Schwangerschaft scheint eine n6-PUFA-arme und n3-PUFA-reiche Ernährungsweise das kindliche Risiko für eine allergische Sensibilisierung und daraus folgende Erkrankungen zu senken (Romieu *et al.* 2007, Sausenthaler *et al.* 2007). Aus LA entsteht in einem endogenen Desaturierungs- und Elongationsprozess die Arachidonsäure (C20:4n6, AA), dem wichtigsten Präkursor der bioaktiven Eicosanoide. Zu den bedeutenden AA-Metaboliten im Rahmen der asthmatischen Exazerbation gehören die – mit Ausnahme von PGE₂ – bronchokonstriktorisches Prostaglandin der 2er-Serie und die ödem- und schleimfördernden Leukotriene der 4er-Serie (Lemanske & Busse 2003, ↑ 1.1.3, Tab. 1). PGE₂ ist an der Regulation der IgE-Synthese beteiligt und begünstigt die Entwicklung der Th2-Population (Gold *et al.* 1994, Roper & Phipps 1994, Miles *et al.* 2003). Der für Fischöl beschriebene schützende Effekt ergibt sich zum Teil daraus, dass die Hauptfettsäure Eicosapentaensäure (C20:5n3, EPA) einerseits über einen Verdrängungseffekt die Verfügbarkeit von AA zur Eicosanoidsynthese reduziert (Healy *et al.* 2000) und andererseits ebenfalls Vorläufer bioaktiver Lipidmediatoren ist und mit AA um die Enzymsysteme zur

Eicosanoidsynthese konkurriert (Wada *et al.* 2007). Wichtige EPA-Abkömmlinge sind z.B. die Prostaglandine der 3er-Serie, die durch unterschiedliche Affinität zu den PG-Rezeptoren unterschiedlich starke Effekte in der Zielzelle hervorrufen (Smith *et al.* 2005, Wada *et al.* 2007). Im Vergleich zu PGE₂ hemmt PGE₃ bspw. die Zellproliferation (Yang *et al.* 2004) und ist ein schwächerer Stimulator der COX-2-Expression (induzierbare Cyclooxygenase) und IL-6-Produktion (Bagga *et al.* 2003). Durch endogene Interkonvertibilität kann die EPA aus Docosahexaensäure (C22:6n3, DHA), der zweithäufigsten Fischfettsäure, bedarfsmäßig bereitgestellt werden (Jump 2002). Bei gleichzeitigem Angebot der Substrate AA und EPA metabolisiert die COX-2 allerdings mit eindeutiger Präferenz AA (Wada *et al.* 2007). Von größerer Bedeutung scheint die nicht-enzymatische Derivatisierung von EPA in die Resolvine der E-Serie und von DHA in die Resolvine der D-Serie (auch als Protektine bezeichnet) zu sein. Diese Docosatriene entfalten ihre antiinflammatorische Wirkung bereits in Konzentrationen im pico- bis nanomolaren Bereich (Ariel & Serhan 2007). Im Asthma-modell hemmen sie nicht nur die phänotypischen Charakteristika wie AHR und Mukusüberproduktion, sondern fördern durch Verschiebung des Zytokinmusters zugunsten von IFN- γ auch die Auflösung der Th2-getriebenen Entzündung (Levy BD *et al.* 2007, Aoki *et al.* 2008, Haworth *et al.* 2008). N3-PUFA können darüber hinaus spezifisch die zelluläre Signalleitung modulieren, indem sie bestimmte Lipiddomänen, sog. »lipid rafts«, in der Zellmembran reorganisieren (Li *et al.* 2006, Siddiqui *et al.* 2007). Dies hat u.a. direkte Konsequenzen für die Aktivierung von T-Zellen (Fan *et al.* 2004, Li Q *et al.* 2005). Schließlich können EPA und DHA auf dem Level der Gentranskription rezeptorvermittelt die Expression von Entzündungsmarkern hemmen (Li H 2005, ↑ 1.3.3).

In der westlichen Ernährungsweise hat sich der Konsum von Margarine auf Kosten der Butter etabliert, was der Diät-Hypothese hinsichtlich des Einflusses von n6-PUFA Rechnung trägt. Eine Reihe epidemiologischer Studien der letzten Dekade konnte zwischen häufigem Margarinekonsum und dem Risiko für Erkrankungen des allergischen Formenkreises eine Verbindung aufzeigen (von Mutius *et al.* 1998, Bolte *et al.* 2001, Dunder *et al.* 2001, Kim JL *et al.* 2005, Sausenthaler *et al.* 2006). Interessanterweise bleibt diese Beziehung in Erwachsenen unabhängig vom Fettgehalt der Margarine stabil (Bolte *et al.* 2005). Zwischen dem regelmäßigen Konsum von Milch und Milchprodukten seit früher Kindheit und der Entwicklung von allergischem Asthma wurde demgegenüber ein signifikant inverser Zusammenhang gefunden, wobei die Herkunft (Riedler *et al.* 2001, Woods *et al.* 2003, Waser *et al.* 2007) und der Fettgehalt (Wijga *et al.* 2003, Woods *et al.* 2003) der Milch von entscheidender Bedeutung zu sein scheinen. Milchfett ist die natürliche Hauptquelle von

konjugierten Derivaten der LA (konjugierte Linolsäuren, CLA). In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Kanwar *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass die Gabe einer CLA-reichen MilCHFettdiät im Mausmodell vor der Entwicklung einer allergischen Atemwegs-entzündung schützt.

1.2 Konjugierte Linolsäuren (CLA)

1.2.1 Nomenklatur

CLA, 1987 erstmals eindeutig beschrieben (Ha *et al.* 1987), sind eine Gruppe von Octadecadiensäuren (C18:2), deren Doppelbindungen in konjugierter Form vorliegen. Bis heute sind 8 Positionsisomeren mit Doppelbindungen an den Kohlenstoffatomen 6/8, 7/9, 8/10, 9/11, 10/12, 11/13, 12/14 oder 13/15 identifiziert worden (Delmonte *et al.* 2005). Da sich die Konjugation theoretisch an den Positionen 2/4 bis 15/17 befinden kann und für jede Doppelbindung *c* (*cis*, *Z*)- und *t* (*trans*, *E*)-Konfiguration möglich ist (Abb. 4), sind 56 geometrische und Positionsisomeren denkbar.

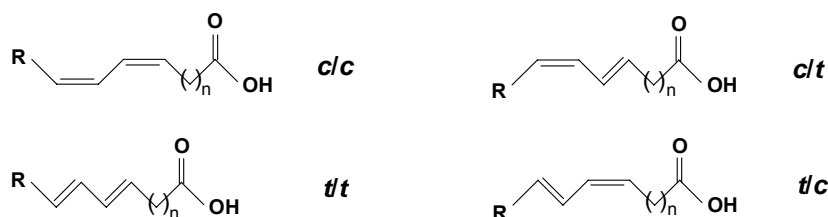


Abb. 4: Stereoisomeren konjugierter Diene.

1.2.2 Biosynthese und natürliches Vorkommen

Die Konjugation des Doppelbindungssystems ist das Resultat einer mikrobiellen Isomerisierung von PUFA im Pansen von Wiederkäuern. Dabei werden CLA als Intermediate bei der Biohydrierung von LA unter dem enzymatischen Einfluß der Linolsäure-Isomerase (EC 5.2.1.5) des Pansenbakteriums *Butyrivibrio fibrisolvens* gebildet. Hierbei entsteht zunächst das *c9,t11*-CLA-Isomere durch stereochemische Verschiebung der Doppelbindung von der *cis*-Stellung am C12 zur thermodynamisch stabileren *trans*-Stellung am C11 (Kepler *et al.* 1971; Abb. 35). Geringe Mengen weiterer Isomeren können von verschiedenen anderen Pansenbakterien synthetisiert werden (Kemp *et al.* 1975, Kim TW *et al.* 2005, Wallace *et al.* 2007). Reduktion von *c9,t11*-CLA liefert die *t11*-Octadecensäure (Vaccensäure, C18:1*t11*), die auch aus höher ungesättigten

Fettsäuren wie α -Linolensäure über Isomerisierungs- und Hydrierungsschritte konvertiert werden kann (Harfoot & Hazelwood 1988, Katz & Keeney 1966; Abb. 5). Vaccensäure und CLA-Isomeren akkumulieren im Pansen oder werden im Darm absorbiert und ins Gewebe und milchbildende Drüsen transportiert. Dort ist endogen die erneute Bildung von $c9,t11$ -CLA aus C18-Monoenen via Desaturierung durch die Δ^9 -Desaturase (Stearoyl-CoA-Desaturase, EC 1.14.99.5) möglich (Griinari *et al.* 2000; Abb. 5).

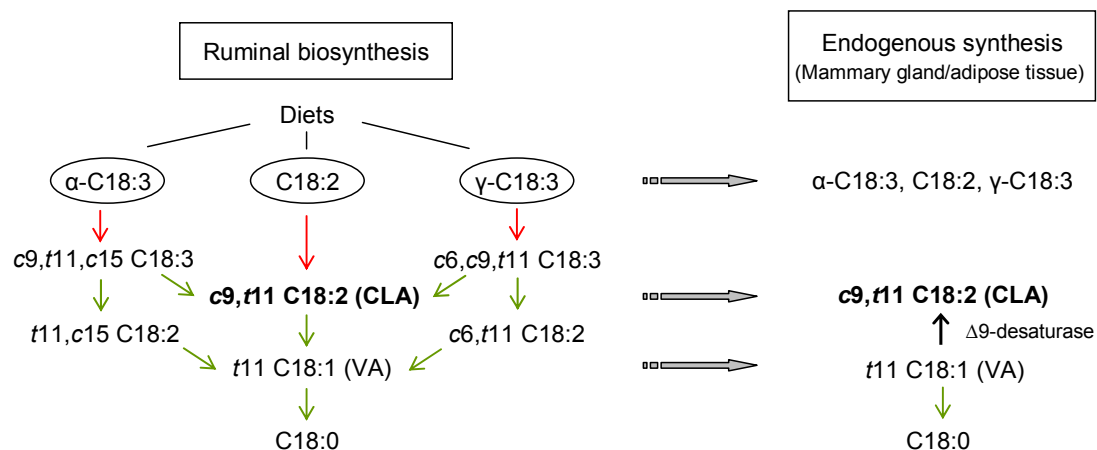


Abb. 5: Biosynthese von CLA im Wiederkäuerpansen (links) und endogene Synthese aus Vaccensäure (rechts). Aus Dhiman *et al.* 2005, verändert. Rote Pfeile = Isomerisierung, grüne Pfeile = Hydrierung.

In wesentlich geringerer Konzentration entsteht das $t7,c9$ -Isomere, vermutlich durch Δ^9 -Desaturierung der C18:1 $t7$ (Corl *et al.* 2002). Da die CLA-Synthese hauptsächlich endogen vonstatten geht (Corl *et al.* 2001, Piperova *et al.* 2002), ist $c9,t11$ -CLA das dominierende natürlich vorkommende CLA-Isomere in Milch, Milchprodukten und Wiederkäuerfleisch. Typische CLA-Gehalte reichen speziesabhängig je nach Fütterungs- und Haltungsbedingungen bzw. saisonalen Einflüssen von 0,2 bis 2,4 g/100 g Fett (Jahreis *et al.* 1997, Jahreis *et al.* 1999, Dhiman *et al.* 1999, Collomb *et al.* 2002, Lock *et al.* 2003), wobei $c9,t11$ -CLA 70-92 % der Gesamt-CLA ausmacht (Chin *et al.* 1992, Fritsche *et al.* 2000, Kraft *et al.* 2008). $T10,c12$ -CLA bspw. zählt mit einem Anteil von 1-3 % an den Gesamt-CLA im Wiederkäuerfleisch (Kraft *et al.* 2008) und <0,5 % in der Milch (Kraft *et al.* 2003, Collomb *et al.* 2004) zu den Minorisomeren. Milch aus Hochland-Weidehaltung weist im Vergleich zu der aus Silagefütterung bis zu 10-fach höhere Gehalte an CLA auf (Kraft *et al.* 2003). Es gibt Bemühungen, den CLA-Gehalt der Milch aus Stall- und temporärer Weidehaltung durch Anreicherung des Futters mit linolsäure- bzw. linolensäurereichen Ölen zu erhöhen (Bu *et al.* 2007, Bouattour *et al.* 2008). Durch Fischölsupplementation des Futters kann ein zusätzlicher Anstieg des CLA-Gehaltes der Milch erzielt werden

(AbuGhazaleh & Holmes 2007, Bharathan *et al.* 2008). In Deutschland beträgt die geschätzte Aufnahme in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Ernährungsweise 300 bis 500 mg CLA pro Person und Tag, wobei ca. 60 % aus Wiederkäuerprodukten zugeführt werden (Fremann *et al.* 2002, Jahreis & Kraft 2002, Steinhart *et al.* 2003). Die Anreicherung von CLA in den menschlichen Geweben, u.a. auch in der Lunge, steht in direkter Relation zur Aufnahme von Milchfett und Wiederkäuerfleisch (Jiang *et al.* 1999). Im Vergleich zu anderen Monogastriden ist die Frauenmilch bei entsprechender Ernährungsweise mit 0,3-0,7 % der Gesamtfettsäuren relativ reich an *c9,t11*-CLA (Jahreis *et al.* 1999). Da die Biokonversion von *c9,t11*-CLA aus der natürlichen *trans*-Fettsäure Vaccensäure auch im menschlichen Gewebe infolge Δ^9 -Desaturasenaktivität möglich ist (Turpeinen *et al.* 2002, Kuhnt *et al.* 2006), kann die im Milchfett enthaltene Vaccensäure zur Erhöhung des CLA-Gehaltes im Körper beitragen (Salminen *et al.* 1998, Fremann *et al.* 2002). Auch aus LA können CLA intestinal konvertiert werden, bspw. durch Isomerasenaktivität von verschiedenen Laktobazillus- (Alonso *et al.* 2003) und Bifidobakterium-Stämmen (Coakley *et al.* 2003).

1.2.3 Kommerzielle CLA-Synthese

1.2.3.1 Bakteriell

Eine Reihe von Mikroorganismen ist aufgrund bakterieneigener Isomerasen in der Lage, aus LA CLA zu bilden. Eine gute Übersicht über *in vitro*-Studien mit verschiedenen Stämmen geben Sieber & Collomb (2004). Das Ziel der Verwendung CLA-produzierender Starterkulturen bei der Herstellung von fermentierten Milchprodukten ist die ernährungsphysiologische Aufwertung dieser Lebensmittel.

1.2.3.2 Chemisch

Heute werden vorwiegend chemisch hergestellte CLA-Präparate zu Forschungszwecken eingesetzt. Die industrielle Herstellung von CLA ist allerdings weitgehend auf die Positions-isomeren 9,11 und 10,12 beschränkt. Die bereits 1951 von Nichols *et al.* beschriebene Methode zur basenkatalysierten Isomerisierung von LA-Methylestern (Nichols *et al.* 1951) ist gut etabliert und liefert CLA-Isomerengemische, die hauptanteilig das *c9,t11*- und das *t10,c12*-CLA-Isomere und weitere Minorisomeren enthalten. Eine umfassende Darstellung der Reaktionsprozesse mit Blick auf die Isomerenkomposition und die Produktqualität lieferten Berdeaux *et al.* (1998). Eine sehr viel selektivere Synthese von *c9,t11*-CLA gelang derselben Arbeitsgruppe durch Dehydratisierung von Methylrizinolat auf der Basis eines

Ansatzes von Gunstone & Said (1971), indem die Ester zunächst mit Methansulfonsäure mesyliert und anschließend in Gegenwart von DBU zu konjugierten Derivaten (66 % *c9,t11*-CLA-Ausbeute) umgesetzt wurden. Das *c9,t11*-Isomere konnte nach Kristallisation mit Harnstoff in einer Reinheit von 83 % isoliert werden (Berdeaux *et al.* 1997). Jie *et al.* beschrieben eine Methode zur Darstellung von *c9,t11*- und *c9,c11*-CLA-Isomeren über zinkkatalysierte Reduktion der Eninstruktur von Santalbinsäuremethylestern (Jie *et al.* 1997). Neben der Reinigung durch Kristallisation bei niedrigen Temperaturen oder mit Harnstoff können einzelne Isomeren mit einer einfachen chemoenzymatischen Methode getrennt werden. Dazu wird zunächst zur Verseifung der Methylester eine regioselektive Lipase, die vorzugsweise PUFA mit einer Doppelbindung am C9 hydrolysiert, eingesetzt. In Gegenwart von 1-Butanol kann das Enzym die Reaktion umkehren und selektiv die Fettsäuren mit Doppelbindung am C9 verestern (Chen & Sih 1998). So erhielt man durch Trennung der Butylester von den freien Fettsäuren und erneutem Separationsvorgang hochreine Isomeren (Chen *et al.* 1999). Die Basis für neue Strategien zur stereoselektiven Synthese und zur Darstellung anderer als die 9,11- und 10,12-Positionsisomeren bereitete die Methode der Suzuki-Kupplung (Miyaura & Suginome 1983). Auf diesem Syntheseweg können durch Umsetzung von Alkenylboronsäureestern und Palladium-Phosphan-katalysierter Verknüpfung mit Brom- oder Iodalkenolen zum konjugierten Dien alle vier Stereoisomeren bspw. der 7,9-CLA erhalten werden (Kellersmann *et al.* 2006).

1.2.4 Physiologische Wirkungen

Seit ihrer Entdeckung als potentiell antikanzerogene Substanzen durch die Arbeitsgruppe von Pariza (Ha *et al.* 1987) ist die Zahl der wissenschaftlichen Berichte über die Wirkungen von CLA exponentiell gestiegen. Zahlreiche Studien an chemisch induzierten Krebsmodellen *in vitro* und *in vivo* erbrachten gut gesicherte Hinweise auf wirksame Effekte in der Karzinogenese (rev. in Kelley *et al.* 2007). Eine Reihe von physiologischen Untersuchungen konzentrierte sich auf potentielle immunmodulatorische Wirkungen der CLA (rev. in O'Shea *et al.* 2004). Weiterhin wurde in Hyperlipidämie- und Diabetesmodellen der Einfluss von CLA auf den Lipid- und Glukosemetabolismus diskutiert (Nicolosi *et al.* 1997, Houseknecht *et al.* 1998). Gleichzeitig wurde nach CLA-Gabe beobachtet, dass sich die Körperzusammensetzung zugunsten der fettfreien Körpermasse verändert (rev. in Wang & Jones 2004). Darüber hinaus scheinen CLA immunassoziierter Kachexie und Wachstumsdepression entgegen zu wirken (Miller *et al.* 1994, Yang M *et al.* 2003, Butz *et al.* 2006) und generell das Wachstum des jungen Organismus positiv zu

beeinflussen (Chin *et al.* 1994). Weil aber die meisten Untersuchungen mit Isomergemischen durchgeführt wurden, die *c9,t11*-CLA und *t10,c12*-CLA zu annähernd gleichen Teilen und geringe Mengen anderer Isomeren enthielten, ließen sich die beobachteten Effekte nicht eindeutig dem einen oder dem anderen Isomeren zuordnen. Die verbesserten Syntheseverfahren zur Darstellung der Einzelisomeren erlauben heute einen sehr viel differenzierteren Einblick in die durchaus unterschiedlichen und teils widersprüchlichen Wirkungsweisen von *c9,t11*-CLA und *t10,c12*-CLA (Tab. 2 und 3).

Tabelle 2: Isomerenspezifische Effekte von CLA am Beispiel von Karzinogenese.

Effekt	<i>c9,t11</i> -CLA	Referenz	<i>t10,c12</i> -CLA	Referenz
Initiation und Promotion	↓ durch Reduktion der Zahl prämaligener Läsionen (<i>Mammakarzinom-Modell</i>)	Ip <i>et al.</i> 2002	↓ durch Reduktion der Zahl prämaligener Läsionen und Hemmung der Elongation und Desaturation von LA (<i>Mammakarzinom-Modell</i>)	Ip <i>et al.</i> 2002
	↓ durch Reduktion der Tumorzellzahl/-größe (<i>Mammakarzinom-Modell</i>)	O'Shea <i>et al.</i> 2000 Lavillonnière <i>et al.</i> 2003	↑ durch Hyperplasie der terminalen duktaalen Strukturen (<i>Mammakarzinom-Modell</i>)	Ip <i>et al.</i> 2007 Meng <i>et al.</i> 2008
Krebszell-Proliferation/ Zellzyklus-Progression	↓ durch Hemmung der c-Myc-, Cyclin D1-, cJun-Expression (<i>Kolonkarzinom-Modell</i>)	Lampen <i>et al.</i> 2005	↑ durch Induktion von Cyclin D1 (<i>Min-Mouse-Modell für intestinale Karzinogenese</i>)	Rajakangas <i>et al.</i> 2003
	↓ durch Hemmung der PCNA-, Cyclin A-, -B1-, -D1- und Stimulation der p21 ^{CIP1/WAF1} -Expression (<i>Magenadenokarzinom-Modell</i>)	Liu <i>et al.</i> 2002a	↓ durch Induktion von p21 ^{CIP1/WAF1} (<i>Prostata- und Kolonkarzinom-Modelle</i>)	Ochoa <i>et al.</i> 2004 Cho <i>et al.</i> 2006
Apoptose	↑ durch Hemmung der anti-apoptotischen bcl-2- und Stimulation der FAS-Expression (<i>Magenadenokarzinom-Modell</i>)	Liu <i>et al.</i> 2002b	↑ durch Überexpression von CHOP und Induktion einer Stressantwort im ER (<i>Mammakarzinom-Modell</i>)	Ou <i>et al.</i> 2008
	↔ (<i>Hepatom-Modell</i>)	Yamasaki <i>et al.</i> 2002 und 2005	↑ durch Destabilisierung der Lysosomen und Cytochrom C-abhängige Aktivierung der Kaspase-9 und -3, (<i>Hepatom-Modell</i>)	Yamasaki <i>et al.</i> 2002 und 2005
Angiogenese	↓ durch Reduktion der VEGF-Serumkonzentration	Masso-Welch <i>et al.</i> 2004	↓ durch Apoptose des Endothels	Masso-Welch <i>et al.</i> 2004
Metastasierung	↓ durch Induktion der TIMP-1 und -2-Expression in Tumorzellen	Yang Y <i>et al.</i> 2003	↑ Streuung in die Lunge	Ip <i>et al.</i> 2007
	↓ durch Hemmung der Migration der Krebszellen	Soel <i>et al.</i> 2007		

Abkürzungen: CHOP · c/EBP-Homologous Protein, ER · Endoplasmatic Reticulum, PBMC · Peripheral Blood Mononuclear Cells, PCNA · Proliferating Cell Nuclear Antigen, RAW264.7 · BALB/c Makrophagen-Zelllinie, TIMP · Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases, VEGF · Vascular Endothelial Growth Factor; ↑ · Stimulation, ↓ · Hemmung, ↔ · kein Effekt

Tabelle 3: Isomerenspezifische Effekte von CLA am Beispiel von Inflammation und zellulärem Stress.

Effekt	c9,t11-CLA	Referenz	t10,c12-CLA	Referenz
Inflammation	↑ TNF- α , IL-6 und ↓ IL-4 in Splenozyten	Kelley <i>et al.</i> 2002	↑ TNF- α , IL-6 und ↓ IL-4 in Splenozyten	Kelley <i>et al.</i> 2002
	↓ TNF- α in Adipozyten durch Downregulation von NF κ B	Moloney <i>et al.</i> 2007	IL-6 ↑ in Adipozyten durch Downregulation von PPAR γ und gesteigerte Expression von NF κ B	Chung <i>et al.</i> 2005 Poirier <i>et al.</i> 2006
	↓ TNF- α -Expression in RAW264.7	Yang M <i>et al.</i> 2003	↑ IL-8 und TNF- α in PBMC, ↑ Phagozytose und ox. Burst	Son <i>et al.</i> 2006 Cho <i>et al.</i> 2008
	↓ COX-2-Expression in der Haut durch Hemmung der IKK- und PI3K-Akt- Signalwege	Hwang <i>et al.</i> 2007	↓ PGE ₂ -Bildung in der Lunge durch Hemmung der COX-2-Expression	Li G <i>et al.</i> 2005
	↓ 5-LOX-Expression	Ochoa <i>et al.</i> 2004	↓ Aktivität und Expression der PLA ₂	Stachowska <i>et al.</i> 2007
	↓ Transaktivierung von NF κ B in vaskulären Muskelzellen	Ringseis <i>et al.</i> 2008	↓ Transaktivierung von NF κ B in vaskulären Muskelzellen	Ringseis <i>et al.</i> 2008
	↓ NF κ B-Aktivierung und IL-12-Produktion in DC durch ERK-vermittelte Induktion von IL-10	Loscher <i>et al.</i> 2005	↓ 5-HETE durch Hemmung der FLAP- Expression ↑ Plasma-CRP und -Fibrinogen	Kim JH <i>et al.</i> 2005 Tholstrup <i>et al.</i> 2008
Zytotoxizität	↔ bei 50 μ M in vaskulären Muskelzellen	Ringseis <i>et al.</i> 2008	↔ bei 50 μ M in vaskulären Muskelzellen	Ringseis <i>et al.</i> 2008
	bei ≥ 80 μ M in Myofibroblasten	Yun <i>et al.</i> 2008	bei ≥ 30 μ M in PBMC	Cho <i>et al.</i> 2008
Oxidativer Zellstress	↓ Bildung von ROS durch Induktion von Phase-2- Enzymen in DC	Bergamo <i>et al.</i> 2008	↑ ROS-Bildung innerhalb der Atmungs- kette und aus extramito- chondrialer Quelle	Stachowska <i>et al.</i> 2008
			↑ renale Exkretion von Lipidperoxidations- produkten	Tholstrup <i>et al.</i> 2008

Abkürzungen: COX · Cyclooxygenase, CRP · C-reaktives Protein, DC · Dendritische Zellen, FLAP · 5-Lipoxygenase Activating Protein, IKK · IkappaB Kinase, LOX · Lipoxygenase, NF κ B · Nuclear Factor- κ B, PBMC · Peripheral Blood Mononuclear Cells, PI3K · Phosphoinositol-3-Kinase, PLA₂ · Phospholipase A₂, RAW264.7 · Balb/c Makrophagen-Zelllinie, ROS · Reactive Oxygen Species, 5-HETE · 5-Hydroxyeicosatetraensäure; ↑ · Stimulation, ↓ · Hemmung, ↔ · kein Effekt

1.3 Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPARs)

Verschiedene metabolische Effekte, die in CLA-supplementierten Labortieren beobachtet wurden, gleichen denen von fettsäureähnlichen chemischen Verbindungen, welche ursprünglich aufgrund ihres Potentials, die verstärkte Bildung von hepatischen Peroxisomen zu induzieren, Peroxisomen-Proliferatoren genannt werden. Peroxisomen-Proliferatoren aktivieren eine Gruppe von nukleären Hormonrezeptoren, den PPARs. (Issemann & Green 1990). Die Aktivierung von PPARs durch Fettsäuren und deren Derivate oder fettsäureähnliche synthetische Verbindungen spielt bei zahlreichen Stoffwechselprozessen eine wichtige regulatorische Rolle (↑ 5.3).

1.3.1 Mitglieder der PPAR-Familie

Die PPAR-Familie umfasst bisher drei isolierte Rezeptor-Isoformen, PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3), die gewebespezifisch exprimiert werden. PPAR β/δ kommt in nahezu allen Geweben vor und erfüllt wichtige Funktionen in der Haut, im Darm, in der Plazenta und im Gehirn (Michalik & Wahli 2007, Hollingshead *et al.* 2007, Nadra *et al.* 2006, Arsenijevic *et al.* 2006). Besonders stark ist seine Expression in Geweben mit hoher oxidativer Kapazität wie Herz und Muskeln (rev. in Seedorf & Aberle 2007). PPAR α wird vorwiegend in der Leber (Mandard *et al.* 2004), aber auch im Endothel (Israelian-Konarakaki & Reaven 2005) und in Immunzellen, z.B. Makrophagen (Paukkeri *et al.* 2007) und T-Zellen (Dunn *et al.* 2007) exprimiert. Von der mRNA für PPAR α sind zwei Spleißvarianten bekannt, jedoch hat PPAR α_2 aufgrund fehlender Ligandenbindungsdomäne (↑ 1.3.2) keine transkriptionale Aktivität (Hanselman *et al.* 2001). Im PPAR γ -Gen sind drei Promotoren identifiziert worden, deren Transkripte die Varianten γ_1 , γ_2 und γ_3 liefern. Allerdings wird die mRNA von PPAR γ_1 und γ_3 zum identischen Proteinprodukt, γ_1 , translatiert (Fajas *et al.* 1998). Die PPAR γ -Subtypen unterscheiden sich aufgrund unterschiedlichen Spleißens im aminoterminalen Ende um 30 Aminosäuren (Zhu *et al.* 1995). PPAR γ_2 kontrolliert konstitutive Funktionen im Fettgewebe (Medina-Gomez *et al.* 2007), PPAR γ_1 wird darüber hinaus im Darm, spezifisch in Chondrozyten und in Zellen des Immunsystems exprimiert und ist im Rahmen der angeborenen sowie erworbenen Immunität und bei der Auflösung von entzündlichen Prozessen von Bedeutung (Are *et al.* 2008, Afif *et al.* 2007, Jakobsen *et al.* 2006, Leininger *et al.* 1999).

1.3.2 Struktur

Wie alle Mitglieder der Kernrezeptoren-Familie besitzen PPARs eine modulare genomische Struktur aus funktionellen Domänen: eine durch Zinkfinger-Motive stabilisierte hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD, Domäne C) bildet zusammen mit einer aus Dimerisierungs- und Transaktivierungsmotiven (AF-2) bestehenden Ligandenbindungsdomäne (LBD, Domäne E) das funktionelle Herz des Rezeptors. Sie werden verbunden durch die D-Domäne, die nach Ligandenbindung die Konformationsänderung vermittelt, und flankiert von der A/B-Domäne mit konstitutiver Aktivierungsfunktion (AF-1) an der aminoterminalen Seite, sowie der F-Region am Carboxy-Terminus (Schoonjans *et al.* 1996; Abb. 6).



Abb. 6: Schematische Struktur der PPARs. AF-1 bezeichnet konstitutive und AF-2 ligandenabhängige Transaktivierungsmotive. Nach Schoonjans *et al.* 1996, modifiziert.

Innerhalb ihrer DBD zeigen die PPARs ca. 80 %ige Homologie in der Aminosäuresequenz, in ihrer LBD zu 60-70 % (Xu *et al.* 2001). Dies ist der Grund weshalb die Isoformen sowohl von verschiedenen als auch gleichen Liganden mit unterschiedlicher Affinität aktiviert werden können und sich die Funktionen der PPARs überschneiden.

1.3.3 Kontrolle der Genexpression

Bei der Regulation der Genexpression durch PPARs sind DNA-abhängige und DNA-unabhängige Mechanismen bekannt. Im Lipid- und Glukosestoffwechsel und bei Zellproliferations- und -differenzierungsvorgängen kontrollieren sie eine Vielzahl von Genen als Transkriptionsfaktoren (Desvergne & Wahli 1999). Die Bindung eines Liganden resultiert in der Konformationsänderung des Rezeptors, worauf repressorische Proteine abgespalten und transkriptorische Coaktivatoren angelagert werden und der Rezeptor in den Kern transloziert (Knouff & Auwerx 2004). Die Bindung an PPAR-responsive Elemente (PPRE) in der Promotorregion der Zielgene erfolgt obligat als Heterodimer, präferentielle Komplexpartner der PPARs sind Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) (Kliewer *et al.* 1992). PPRE bestehen aus zwei hexameren Konsensussequenzen, den »half sites«, mit charakteristischen Basenfolgen, die von beiden Dimerpartnern erkannt werden (Ijpenberg *et al.* 1997; Abb. 7). Entsprechend sind sowohl PPAR- als auch RXR-Liganden in der

Lage, die Transkription von Genen mit PPRE-Enhancermotiven zu induzieren (Kliwer *et al.* 1992).

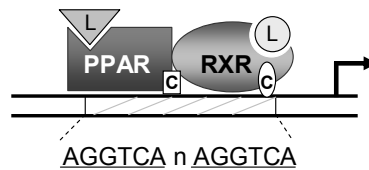


Abb. 7: PPARs als Transkriptionsfaktoren. Die Anlagerung des PPAR-RXR-Dimers an die DNA erfolgt nach Bindung des/der Liganden (L) und Coaktivatoren mit Histonazetylase-Aktivität (C). Erkennungsmotive im PPRE sind durch ein Nukleotid getrennte repetitive Sequenzen, sog. DR-1. Nach Schoonjans *et al.* 1996.

PPARs können die Genexpression auch durch DNA-unabhängige Mechanismen modulieren, indem sie die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren beeinflussen und selbst nicht als solche agieren. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören NFκB, AP-1, NFAT und STATs, deren Signalwege in akute und chronische Entzündungsprozesse involviert sind und die bei Immunstimulation die Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene kontrollieren. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die PPAR-Aktivierung die Homo- oder Heterodimerisierung der Transkriptionsfaktoren und somit ihre Bindung an responsive Elemente in der Promotorregion der Zielgene blockiert (Delerive *et al.* 1999 und 2001, Wang P *et al.* 2001, Chung *et al.* 2003; Abb. 8).

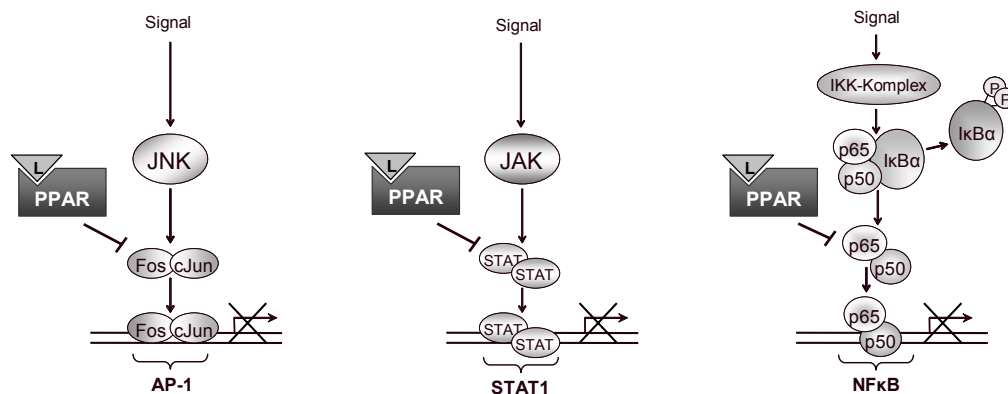


Abb. 8: Schema der PPAR-vermittelten Entzündungshemmung. Die Aktivierung von PPAR γ verhindert durch Hemmung der Transkriptionsfaktoren AP-1, STAT1 und NFκB die Transkription der Zielgene. Nach Delerive *et al.* 2001, verändert.

Abkürzungen: AP-1 · Activator Protein-1, IκB · Inhibitory kappaB, IKK · IκB Kinase, JAK · Janus Kinase, JNK · c-Jun-NH2-Terminal Kinase, NFκB · Nuclear Factor-κB, STAT · Signal Transducer and Activator of Transcription

Auch durch Bindung der coaktivierenden Proteine können PPARs die transkriptionelle Aktivität inhibieren (Subbaramaiah *et al.* 2001). Darüber hinaus wird der liganden-gebundene Rezeptor durch allosterische Veränderung in der LBD (SUMOylation, d.h.

kovalente Bindung von small ubiquitin-like modifier an Lysin-Reste) zur Transrepression aktiviert und bindet an corepressorische Komplexe im Genpromotor. Dies verhindert deren proteosomale Degradation und damit die Transkription der Zielgene (Pascual *et al.* 2005). Ligandenunabhängig kann die PPAR-Aktivität durch posttranslationale Modifikation des Moleküls beeinflusst werden, z.B. durch MAPK-katalysierte Phosphorylierung (Blanquart *et al.* 2003). In Abwesenheit eines Liganden übernehmen die vom PPAR-RXR-Heterodimer rekrutierten Corepressoren, Histondeazetylasen und Chromatin-modifizierende Faktoren die Repression der Gentranskription (Privalsky 2004).

1.3.4 PPARs und Atemwegsentzündung

Die entzündungshemmende Wirkung der PPAR-Aktivierung könnte im Hinblick auf Bronchialasthma von besonderer Bedeutung sein, indem PPAR-Agonisten gezielt präventiv und therapeutisch eingesetzt werden (Serhan & Devchand 2001, Denning & Stoll 2005). *In vitro* modulieren PPAR γ -Liganden eine Reihe von asthmaassoziierten Zellfunktionen von Alveolar-Makrophagen (Ricote *et al.* 1998, Reddy 2008) und dendritischen Zellen (Nencioni *et al.* 2002), Atemwegsepithelzellen (Wang A *et al.* 2001), Endothelzellen (Imamoto *et al.* 2004), Eosinophilen (Matsuwaki *et al.* 2005), Lymphozyten (Clark *et al.* 2000) und glatten Muskelzellen der pulmonalen Vaskulatur (Patel *et al.* 2003). Diese umfassen die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, NOS) und Metalloproteinasen, die Zellaktivierung, -differenzierung und -proliferation, die Migration, Adhäsion, Phagozytose und Mukussekretion (rev. in: Becker *et al.* 2006). In zahlreichen *in vivo*-Modellen wurden für PPAR γ -Liganden suppressive Effekte sowohl bei akuter als auch chronischer Atemwegsentzündung gezeigt (rev. in: Belvisi & Hele 2008). PPAR γ ist in den Atemwegen nicht nur Vermittler von antiinflammatorischen Mechanismen, sondern scheint bereits in der postnatalen Entwicklung des Lungenepithels als integrale Barriere eine Schlüsselrolle zu spielen (Simon *et al.* 2006). Die Beobachtung, dass PPAR α -defiziente Mäuse verstärkt und anhaltend auf inflammatorische Stimuli reagierten, führte zu der Annahme, dass auch diese Rezeptorisoform bei Entzündung von Bedeutung ist. So könnte der Mangel an PPAR α einen verzögerten β -oxidativen Abbau von inflammatorischen Lipidmediatoren zur Folge haben (Devchand *et al.* 1996). Mittlerweile gibt es ebenfalls genügend Hinweise für einen entzündungshemmenden Effekt der PPAR α -Aktivierung in Immun- und Effektorzellen, z.B. durch Hemmung der Chemotaxis von Monozyten und Eosinophilen, Suppression der eosinophilen Zytotoxizität und Inhibition der T-Zell-proliferation (rev. in: Becker *et al.* 2006, Belvisi & Hele 2008). Im Asthma-Mausmodell

verhindern PPAR α -Liganden die Endotoxin- oder allergeninduzierte Downregulation von PPAR α und hemmen die damit assoziierte Atemwegsentzündung (Becker *et al.* 2008). PPAR β/δ scheint in der Prävention bzw. Behandlung von allergischer Atemwegsentzündung unbedeutend zu sein (Trifilieff *et al.* 2003). Allerdings inhibieren PPAR β/δ -Agonisten die Proliferation von Lungen-Fibroblasten und verstärken den antifibrotischen Effekt von PPAR γ (Ali *et al.* 2006, Burgess *et al.* 2005). Darüber hinaus impliziert seine Funktion als Regulator der Wundheilung und Homöostase der Hautbarriere antiinflammatorisches Potential (Tan *et al.* 2001, Man *et al.* 2008).

1.3.5 CLA entfalten entzündungshemmende Wirkung via PPARs

Erste Beweise dafür, dass CLA-Isomeren natürliche Liganden von PPARs sind, lieferten Moya-Camarena *et al.* (1999). Mittels kompetitivem »scintillation proximity assay« konnten sie zeigen, dass CLA im nM-Bereich potente Aktivatoren von PPAR α sind, wobei *c9,t11*-CLA verglichen mit anderen Isomeren wie *t10,c12*- und *c9,c11*-CLA die höchste Affinität besitzt. PPAR γ wird von CLA mit relativ geringerer Affinität in halb-effektorischer Konzentration im μ M-Bereich aktiviert (Belury *et al.* 2002). In Makrophagen inhibieren CLA via PPAR γ -Aktivierung die Expression der COX-2 und iNOS (induzierbare Stickstoffoxid-Synthase), sowie die Sezernierung der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Yu *et al.* 2002). In vaskulären Muskelzellen hemmen CLA PPAR γ -vermittelt die Transaktivierung von NF κ B und die zytokininduzierte Eicosanoidproduktion (Ringseis *et al.* 2006 und 2008). Die antiinflammatorischen Effekte von CLA im experimentellen Colitis-Modell involvieren ebenfalls PPAR γ (Bassaganya-Riera *et al.* 2006). In diesen Studien erwies sich sowohl das *c9,t11*- als auch das *t10,c12*-CLA-Isomere bzw. die kombinierte Gabe als antiinflammatorisch wirksam. In anderen Studien zeigte *t10,c12*-CLA keine (Jaudszus *et al.* 2005) oder sogar proinflammatorische Effekte (Tab. 3).

2 Zielstellung

2.1 Hypothese

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass *c9,t11*-CLA als natürlicher Ligand von $\text{PPAR}\gamma$ über eine entzündungshemmende Wirkung zum protektiven Effekt von Milchkonsum auf die Entstehung von allergischem Asthma bronchiale beiträgt.

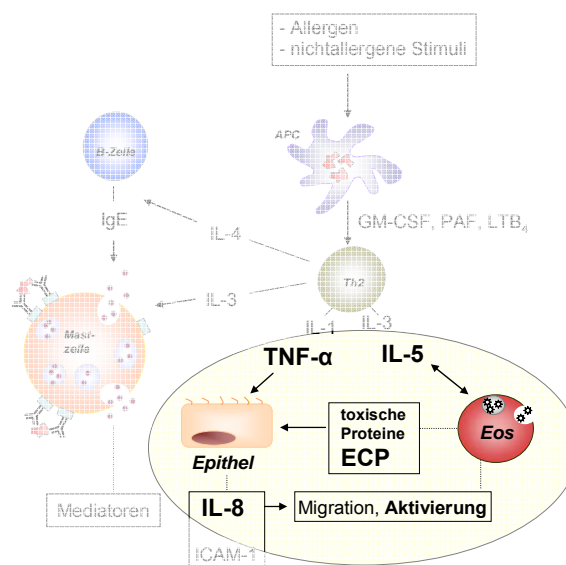
2.2 Spezielle Zielstellung

2.2.1 Teil I: Immunologie

2.2.1.1 *In vitro*-Modell

In diesem Teil der Arbeit sollte ein *in vitro*-Modell zur Darstellung eines relevanten Ausschnittes der komplexen Wechselwirkungen bei allergischer Atemwegsentzündung etabliert werden (Abb. 9).

Abb. 9: Überlegung zum Versuchsaufbau der *in vitro*-Studie. Ellipse: die Interaktion von Epithelzellen und Eosinophilen als kleiner Ausschnitt der komplexen Wechselwirkungen bei allergischer Entzündung.



Im Speziellen sollte getestet werden, ob eine Intervention mit *c9,t11*-CLA in physiologischer Konzentration die stimulusinduzierte Aktivierung und Produktion von Entzündungsmediatoren in humanen Bronchialepithelzellen und Eosinophilen hemmen kann. Dazu sollte in BEAS-2B (humane Bronchialepithel-Zelllinie) die Wirkung von *c9,t11*-CLA auf die IL-8-Bildung auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht werden. Von besonderem Interesse sollte hierbei die Klärung der Frage sein, inwieweit mögliche Hemmeffekte von *c9,t11*-CLA in den Epithelzellen durch den Rezeptor $\text{PPAR}\gamma$ vermittelt werden. Desweiteren sollte die

Wirkung von *c9,t11*-CLA auf den Aktivierungsstatus von eosinophilen Granulozyten anhand einiger von ihnen exprimierter Oberflächenantigene untersucht werden. Die Eosinophilen sollten aus dem peripheren Blut von allergischen Spendern gewonnen werden. In einer Co-Kultur von BEAS-2B und Eosinophilen sollte dann der Effekt einer *c9,t11*-CLA-Zugabe auf die zytokininduzierte ECP-Bildung analysiert werden.

2.2.1.2 *In vivo*-Modell

In einem Mausmodell sollte geprüft werden, ob die orale Gabe einer *c9,t11*-CLA-angereicherten Diät eine entzündungshemmende Wirkung auf die Ausbildung einer allergischen Atemwegshyperreaktivität und -entzündung hat

- a) durch Hemmung einer allergischen Sensibilisierung (**Primäre Prävention**)
- b) durch Immunmodulation nach einer allergischen Sensibilisierung (**Sekundäre Prävention**)

Auch in diesen Studien sollte geklärt werden, ob die Effekte von *c9,t11*-CLA durch PPAR γ -Aktivierung vermittelt werden.

2.2.2 Teil II: Metabolismus

In diesem Teil der Studie sollte die Verteilung der den Diäten zugesetzten Fettsäuren in verschiedenen lipogenen Organen/Geweben untersucht werden. Im Speziellen sollte die Metabolisierung des *c9,t11*-CLA-reichen Triazylglyzerols und die Auswirkung auf die Fettsäurenspektren der Organe/Gewebe geprüft werden. Dies war besonders im Hinblick auf Toxizitäts- und Sicherheitsaspekte im Vergleich zu einem bereits als Nahrungsergänzungsmittel genutzten CLA-Präparat von Interesse.

3 Material und Methoden

In vitro-Modell

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Stimulanzen und Inhibitoren

3.1.1.1 Fettsäuren

Zur Herstellung der Stammlösungen der freien Fettsäuren *c9,t11*-CLA und LA (> 98 % Reinheit; MW je 280,45 g/l; Matreya, Pleasant Gap, USA) wurden jeweils 10 mg der Fettsäuren eingewogen und in je 1 ml Ethanol gelöst. Die Fettsäuren-Stammlösungen wurden in Aliquots à 100 µl mit N₂ überschichtet und bei 4 °C gelagert. Für die Zellversuche wurden die Fettsäuren mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

3.1.1.2 PPAR γ -Antagonist GW9662

Die Substanz GW9662 (MW 276,7 g/l; Axxora, Grünberg, D) wurde, wie vom Hersteller empfohlen, in Pulverform bei -20 °C aufbewahrt. Für jeden Versuch wurde die Gebrauchslösung frisch hergestellt und in einer Endkonzentration von 2 µM GW9662 eingesetzt.

3.1.1.3 Lipopolysaccharid

10 mg LPS (E. coli Serotyp 026:B6, lyophilisiert, Sigma-Aldrich, München, D) wurden in 1 ml PBS/2 % FKS (Biochrom, Krefeld, D) gelöst und in Aliquots à 25 µl bei -80 °C aufbewahrt. Die Endkonzentration von LPS im Medium betrug 5 µg/ml.

3.1.2 Die Zelllinie BEAS-2B

3.1.2.1 Kultivierung

Bei der Zelllinie BEAS-2B (ATCC No. CRL-9609; Abb. 10) handelt es sich um diploide humane bronchialepitheliale Zellen, die durch Infektion mit Adenovirus-12 SV 40 Hybrid-Viren genetisch transformiert und immortalisiert worden waren (Reddel 1988). Trotz der bekannten genetischen Veränderungen behielt die Zelllinie die typischen morphologischen und funktionellen Eigenheiten und zeigt eine kontinuierliche Wachstumstendenz (Ke 1988).

BEAS-2B wurden als Monolayer-Adhäsionskulturen in 75 cm²-Polystyrol-Zellkulturflaschen (Nunc, Langenselbold, D) unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 95 % relative Feuchte und 5 % CO₂) in humid-atmosphärischen Begasungsbrutschränken (Heraeus Instruments, Hanau, D) gehalten. Vor Arbeitsbeginn wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer sterilen Arbeitsbank (Laminar Air Flow, Heraeus).

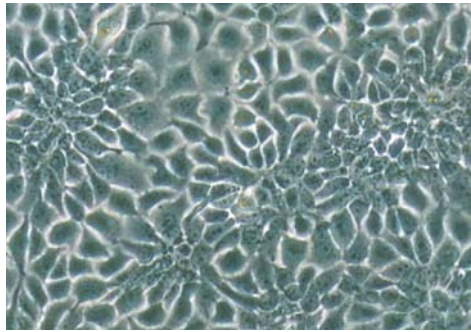


Abb. 10: Konfluente BEAS-2B. (Vergrößerung 1:40; Kamera: Praktika BC1; freundliche Leihgabe des Klinischen Medienzentrums der FSU Jena)

Nach Erreichen von 80-90 %iger Konfluenz (ca. 6×10^6 Zellen/75 cm²-Flasche) wurde das Medium (BEGM[®]: BEBM[®] + SingleQuots[®], Cambrex, St. Katharinen, D) abgesaugt, der adhärente Zellrasen mit 5 ml HBSS (Cambrex) gespült und zum Ablösen der Zellen mit 5 ml Accutase (PAA Laboratories, Linz, A) 8-10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (1500 rpm, 6 min, 20 °C) und das Pellet zur Bestimmung der Zellzahl in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension im Split 1:3 oder mit gewünschter Zellzahl neu eingesät.

3.1.2.2 *Langzeitlagerung*

Die Zellen wurden mit Accutase gelöst, zentrifugiert, in Medium mit 20 % FKS und 10 % DMSO (Sigma) aufgenommen, in sterile Einfrierröhrchen aliquotiert (1 ml à 1×10^6 Zellen), graduell auf -80 °C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen im 37 °C-Wasserbad rasch erwärmt, mit 10 ml Medium verdünnt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und in ein frisches Kulturgefäß eingesät. Am nächsten Tag erfolgte der Mediumwechsel und darauffolgend jeden zweiten Tag.

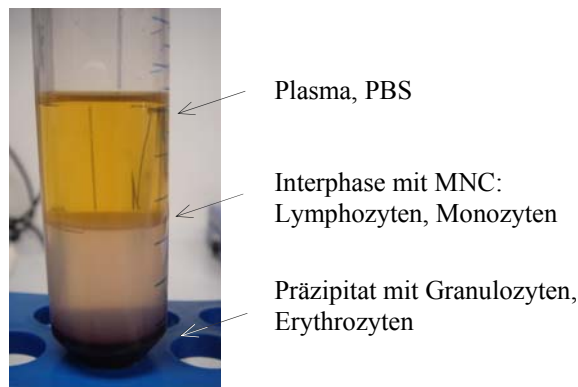
3.1.3 Stimulation der BEAS-2B

1×10^5 BEAS-2B wurden in 1 ml BEGM[®] in 24-Well-Platten (Nunc) eingesät. Nach 24 h wurden die Zellen in frischem Medium zunächst mit 2 μ M des PPAR γ -Antagonisten GW9662 für 30 min präinkubiert, bevor das Medium mit 10 μ g/ml *c9,t11*-CLA oder LA supplementiert wurde. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Medium mit 5 μ g/ml LPS und 1 % Serum von allergischen Spendern ergänzt. Als Kontrollen wurden fettsäurefreie unstimulierte und stimulierte Kulturen mit 0,1 % Ethanol mitgeführt. Für die IL-8-Analyse mittels ELISA wurde der Kulturüberstand nach 24 h Inkubation abgenommen, zentrifugiert (1500 rpm, 6 min, 4 °C) und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Für die Bestimmung der IL-8-Genexpression betrug die Inkubationsdauer 8 h.

3.1.4 Isolierung und Aufreinigung von Eosinophilen

Peripheres venöses Blut von allergischen Spendern (ca. 90 ml in EDTA) wurde zunächst mit PBS (Cell Concept, Umkirch, D) 1:1 verdünnt. Anschließend wurden Aliquots von 25 ml über 20 ml isotonische Percoll-Lösung (Dichte 1,077 g/cm³, Pharmacia, Uppsala, S) geschichtet und in einer Dichtegradienten-Zentrifugation (30 min, 2200 rpm, 20 °C, ohne Bremse) fraktioniert. Der Plasma-Überstand sowie die Interphase wurden vorsichtig bis zum Präzipitat abgenommen und verworfen (Abb. 11).

Abb. 11: Schichtung der Blutbestandteile nach Dichtegradienten-Zentrifugation.



Zur hypotonen Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen für 10 min in 10 ml Ammoniumchlorid-Puffer (0,155 M in 0,01 M Tris-HCl-Puffer, steril, Sigma) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, mit PBS gewaschen und das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS/2 % FKS resuspendiert. Die Zellpopulationen wurden mit Kimura (Sigma) differenziert und mittels Hämocytometer kalkuliert.

Zur Aufreinigung der eosinophilen Granulozyten kam die Methode des »magnetic-assisted cell sorting« (MACS) zum Einsatz. Prinzip ist die Markierung der anzureichernden (positive selection) oder der zu depletierenden Zellpopulation (negative selection) mit antikörperkonjugierten magnetischen Mikropartikeln. Die Suspension aus markierten und unmarkierten Zellen wird auf eine Trennsäule gegeben, die mit Stahlwolle gefüllt ist und sich zwischen den Polen eines Hochleistungsmagneten befindet. Beim Durchfließen der Säule werden die markierten Zellen zurückgehalten und so von den unmarkierten getrennt.

Die Zellsuspension wurde mit anti-CD3- ($10 \mu\text{l}/1 \times 10^6$ Lymphozyten) und anti-CD16-MicroBeads ($5 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Neutrophile und Monozyten) inkubiert ($\frac{1}{2}$ h rotierend im Kühlschrank), anschließend über eine konditionierte Trennsäule gespült (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D) und mit ca. 40 ml PBS/2 % FKS in ein auf Eis stehendes Tube eluiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml PBS/2 % FKS resuspendiert und Zellzahl und Reinheit der Eosinophilen nach erneuter Kimura-Färbung bestimmt.

3.1.5 Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) bietet die Möglichkeit, einerseits Populationen heterogener Zellsuspensionen bezüglich ihrer morphologischen Eigenschaften (Zellgröße, Granularität, Membranfaltung) zu charakterisieren und andererseits Aussagen zum Reife- und Aktivierungszustand einzelner Zellen anhand der von ihnen exprimierten antigenen Epitope oder intrazellulären Moleküle zu treffen. Dazu werden die Zellen spezifisch mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer einzeln hydrodynamisch fokussiert. Monochromatisches Laserlicht führt zur Exzitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die ihrerseits Fluoreszenzen emittieren (Tab. 4).

Tabelle 4: Gebräuchliche Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluorochrom	Emittierte Wellenlänge	Fluoreszenz
FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	520 nm	grün
PE (R-Phycoerythrin)	575 nm	rot
PI (Propidiumiodid)	650 nm	violett
APC (Allophycocyanin)	660 nm	violett

Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei zur Anzahl der antikörpergebundenen Oberflächenmoleküle bzw. intrazellulären Strukturen proportional. Eine Mehrfarbenanalyse ist möglich unter Verwendung von Fluorochromen, deren Emissionsspektren

deutlich voneinander entfernt sind (Tab. 4). Zur Charakterisierung morphologischer Zelleigenschaften werden gleichzeitig Streulichtsignale photometrisch detektiert. Das vorwärts gestreute Licht (forward scatter, FSC) wird von einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls gesammelt und gibt in Abhängigkeit vom Refraktionsindex Aufschluss über die Zellgröße. Eine im rechten Winkel dazu angebrachte Linse sammelt das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC), das mit der Granularität korreliert. So können pro Zelle mehrere Parameter erfasst werden, die sie in Abhängigkeit ihrer optischen Eigenschaften als Messereignis definieren.

Die aufgereinigten Eosinophilen (1×10^5 Zellen/250 μ l) wurden in 96-Wellplatten in RPMI-1640 (Cell Concept) mit Zusätzen* zunächst für 1 h mit oder ohne *c9,t11*-CLA (10 μ g/ml) bei 37 °C inkubiert und dann mit IL-5 (10 ng/ml; Cell Concept) allein oder zusammen mit TNF- α (30 ng/ml; Cell Concept) stimuliert. Nach 18 h Inkubation wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1500 rpm, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 200 μ l PBS/2 % FKS resuspendiert. 50 μ l der Zellsuspension (ca. 2×10^4 Zellen) wurden mit 10 μ l FITC-konjugiertem anti-CD13-mAk (Klon MY7; Immunotech, Marseille, F) und 10 μ l PE-konjugiertem anti-CD69-mAk (Klon FN50; BD Pharmingen, Heidelberg, D) für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle der unspezifischen Fluoreszenz wurde ein Ansatz mit isotypspezifischen Antikörpern (FITC- bzw. PE-konjugiertes IgG1) markiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in PBS/2 % FKS gewaschen, in 200 μ l PI-Lösung (0,5 μ g/ml PBS; Sigma) aufgenommen und durchflusszytometrisch mit mindestens 10.000 Zellen pro Ansatz im FACSCalibur (BD) gemessen. PI ist ein fluoreszierender DNA-Interkalator, der für vitale Zellen nicht membranpermeabel ist. Bei nekrotischen und spätapoptotischen Zellen kann PI die perforierte Zellmembran passieren und die DNA anfärben und somit der Lebend-Tot-Diskriminierung dienen. PI-positive Zellen wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Analyse sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software CellQuestPro® (BD).

* 10 % hitzeinaktiviertes FKS (Biochrom, Krefeld, D)
2 mM L-Glutamin (Seromed, Berlin, D)
100 IU/ml Penicillin (Gibco, Eggenstein, D)
100 μ g/ml Streptomycin (Gibco)

3.1.6 Co-Kultur von BEAS-2B und Eosinophilen

BEAS-2B wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml BEGM[®]/Kavität in 24-Well-Platten eingesät und zum Adhärenzieren für 24 h im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde gewechselt und die Zellen wurden für weitere 24 h mit oder ohne Zusatz von TNF- α (30 ng/ml) inkubiert. Dann wurde das Medium aspiriert und der Zellrasen mit HBSS gespült. Frisch isolierte Eosinophile (5×10^4 Zellen) wurden in 1 ml RPMI-1640 mit Zusätzen (\uparrow 3.1.5), das mit c9,t11-CLA (10 μ g/ml) allein oder zusätzlich mit IL-5 (10 ng/ml) supplementiert wurde, zur BEAS-2B-Kultur gegeben. Als Kontrollen wurden fettsäurefreie unstimulierte und stimulierte Kulturen mit 0,1 % Ethanol mitgeführt. Nach 18 h Inkubation wurde die Zellsuspension abgenommen, zentrifugiert (1500 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand bis zur ECP-Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Extraktion

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den BEAS-2B-Stimulationsansätzen (\uparrow 3.1.3) wurde ein kommerzielles Kit (Roche, Mannheim, D) verwendet. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit 2 ml HBSS gespült, danach in 200 μ l Lyse-/Bindepuffer homogenisiert und in RNase-freien Caps 3-5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf Silicagelsäulchen gegeben, 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Restliche an der Säule bindende DNA wurde mit 100 μ l DNase-Lösung (Roche) für 15 min bei RT verdaut und in einem darauffolgenden Waschschrift entfernt. In zwei weiteren Waschschriften wurde die gebundene RNA von Salzen und makromolekularen Zellkomponenten gereinigt. Zum Schluss wurde die RNA mit 50 μ l RNase-freiem Wasser von der Matrix eluiert (2 min, 12.000 rpm) und bei -80 °C gelagert.

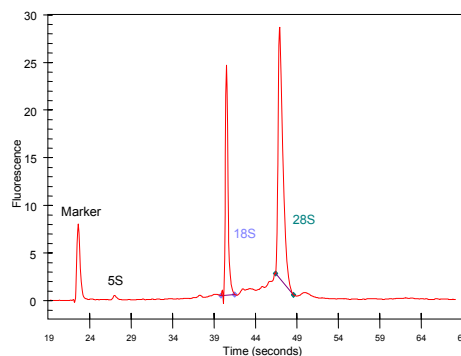
3.2.1.1 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte photometrisch am Nanodrop (Peqlab, Erlangen, D) in μ g/ml unter Berücksichtigung des Quotienten der Extinktionen bei $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum für Proteine), der 1,9 bis 2,1 betragen sollte.

3.2.1.2 Qualitätskontrolle

Die Qualität der RNA wurde mittels Integritätsmessung am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, D) bestimmt. Bei Vorliegen von intakter RNA (RNA Integrity Number/RIN = 10) waren die Peaks der 28S und 18S-ribosomalen Untereinheiten klar abgegrenzt in einem ungefähren Intensitätsverhältnis von 2:1 nachweisbar und keine Degradationsprodukte als niedermolekulares »Rauschen« erkennbar (Abb. 12). Der RIN-Wert lag für alle Proben über 9.

Abb. 12: Repräsentatives Elektropherogramm einer intakten RNA. Die RNA Integrität wurde mittels RIN Software (Agilent Technologies) bestimmt.



3.2.2 Reverse Transkription

Da die DNA-Vervielfältigung von DNA-abhängigen DNA-Polymerasen katalysiert wird, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren, muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu kommt die Reverse Transkriptase zum Einsatz, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

2 µg RNA (auf 10 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt) wurden zunächst mit 4 µl Oligo(dT)Primer (100 mM) 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Dann wurde ein Mix dazu pipettiert, bestehend aus:

M-MLV-RT 5×Puffer	5 µl	
RNasin [®] Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl)	1 µl	
dNTPs (10 mM)	2 µl	
M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	(alles Stratagene, La Jolla, CA)

Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne M-MLV-RT bzw. ohne RNA-Template mitgeführt. Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert, zur Inaktivierung auf 90 °C erhitzt und nach 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die cDNA-Proben mit DEPC-H₂O auf 50 µl aufgefüllt und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht schließlich die spezifische Amplifikation der Transkripte. Das Prinzip der Reaktion ist die *in vitro*-Replikation des durch Primer-Markierung genau definierten Abschnittes, z.B. eines Gens oder auch einer nichtkodierenden Sequenz, meist mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Der Amplifikationsprozess läuft in 30-50 Zyklen ab, die jeweils aus 3 Reaktionsschritten bestehen: zunächst wird die DNA bei hohen Temperaturen zu Einzelstrangmatrizen aufgeschmolzen (Denaturierung), an die sich die Primer bei gemäßigten Temperaturen anlagern (Annealing). In der Elongationsphase (Polymerisation) wird der fehlende Strang von der Polymerase in Gegenwart von freien dNTPs am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnend aufgefüllt. Das entstandene Amplifikat verdoppelt sich in den folgenden Zyklen exponentiell, wodurch man eine große Menge Ziel-DNA erhält.

Der Reaktionsansatz für 25 µl war folgendermaßen zusammengesetzt:

Taq 10×Puffer	2,5 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl	
FW Primer (25 µM)	1 µl	
RV Primer (25 µM)	1 µl	
dNTPs (10 mM)	2 µl	
cDNA-Template	2,5 µl	
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	1 µl	
DEPC-H ₂ O	14 µl	(Reagenzien und Puffer: Roche)

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Stratagene) unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms durchgeführt:

Aktivierung der Taq: 95 °C, 5 min

30 Zyklen:

Denaturierung: 95 °C, 1 min

Annealing:

IL-8: 58 °C, 1 min

Cyclophilin: 60 °C, 1 min

Polymerisation: 72 °C, 1 min

Finale Elongation: 72 °C, 10 min

Tabelle 5: Verwendete Primerpaare zur Amplifikation von IL-8

Gen	Nukleotidsequenz	Fragmentgröße
IL-8	FW: 5'-CTT GGC AGC CTT CCT GAT TT-3'	200 bp
	RV: 5'-CTC AGC CCT CTT CAA AAA CT-3'	
Cyclophilin	FW: 5'-CAT CTG CAC TGC CAA GAC TG-3'	326 bp
	RV: 5'-CTG CAA TCC AGC TAG GCA TG-3'	

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine analytische Standardmethode, um Nukleinsäurenstränge nach ihrer Größe zu trennen und zu identifizieren. Dabei laufen die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes je nach Größe unterschiedlich schnell durch ein poriges Gel aus Agarosepolymeren. Zur Identifizierung wird das Gel mit einem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (meist Ethidiumbromid) angefärbt. Durch die Interkalation verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes und seine Fluoreszenz wird bei Anregung stark erhöht. Betrachtet man das gefärbte Gel unter UV-Licht, leuchten die Nukleinsäuren in Abhängigkeit von ihrer Konzentration hell auf.

Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurde 1 g Agarose (Sigma) mit 100 ml TBE-Puffer bis zum vollständigen Auflösen in der Mikrowelle erhitzt. Das Gemisch wurde zum Abkühlen ca. 2 min stehengelassen, anschließend mit 3 µl Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, D) versetzt und luftblasenfrei in einen mit Kamm bestückten Gelträger gegossen.

TBE-Puffer: 10,78 g Tris, 5,5 g Borsäure, 0,58 g EDTA (alles Sigma)
auf 1000 ml Aqua dest. (pH 8,0)

Das ausgehärtete Gel wurde nach Entnahme des Kammes in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (Preglab) gelegt und mit Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl 5×Ladepuffer (Bioline, Luckenwalde, D) vermischt, der das Absinken der Proben durch seinen Gehalt an Glycerin und das visuelle Abschätzen der Laufweite durch den enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau ermöglichte. Die Proben wurden neben einen als Standard dienenden 100 bp DNA-Marker (Roche) in die Geltaschen pipettiert, dann wurde die Elektrophorese bei angelegten 100 V gestartet (Spannungsgeber: Biometra, Göttingen, D). Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht (312 nm, UV-Transilluminator: Biostep, Jahnsdorf, D) mithilfe der Software Phoretix Grabber v3.01 aufgezeichnet und mit der Software Phoretix 1D Advanced v4.01 (Biostep) densitometrisch ausgewertet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 ELISA zur Quantifizierung von IL-8

Die Konzentration von IL-8 in den Kulturüberständen wurde im »Sandwich- oder capture-ELISA« bestimmt. Bei diesem Test werden antigenspezifische Antikörper an einem Träger immobilisiert, die das zu bestimmende Antigen mit hoher Affinität binden und so auf der Trägoberfläche konzentrieren. Ein weiterer enzymmarkierter Detektorantikörper, der im Vergleich zum fixierten Antikörper ein anderes Epitop auf dem Antigen erkennt, dient dann zum Nachweis des Antigens. Dies geschieht nach Zugabe eines Chromogens anhand einer enzymatischen Farbreaktion, die im Photometer verfolgt werden kann und deren Produkt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens ist.

Spezielle ELISA-Platten (MaxiSorp[®]C96, Nunc) wurden mit dem Primärantikörper (100 µl/well) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Nach dreimaligem Waschen wurden die überschüssigen adhäsiven Stellen blockiert (300 µl/well, 60 min, RT). Anschließend wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und mit jeweils 100 µl der (ggf. verdünnten) Proben und einer Standardserie für 2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde der Detektorantikörper aufgebracht (100 µl), die Platten nach 60 min Inkubation (RT, Schüttler) erneut dreimal gewaschen und das Enzymreagenz (100 µl) aufgetragen. Nach weiteren 30 min (RT, dunkel) und einem weiteren Waschschrift (achtmal) wurde das Substratreagenz hinzugefügt und die einsetzende Redoxreaktion nach etwa 30 min gestoppt. Die Extinktion wurde photometrisch gemessen (Testfilter: 450 nm, Referenzfilter: 570 nm) und die Konzentration des Interleukins mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Die Nachweisgrenze betrug 8 pg/ml.

Zusammensetzung der Lösungen:

<u>Coating:</u>	Primärer Antikörper: Anti-Human-IL-8-mAk (Klon G 265-5, BD Pharmingen): 2 µg/ml in Coating-Puffer
<u>Coating-Puffer:</u>	7,13 g NaHCO ₃ , 1,59 g Na ₂ CO ₃ in 1 l Aqua dest. lösen, mit 10 N NaOH auf pH 9,5 einstellen (alles Merck, Darmstadt, D)
<u>Waschpuffer:</u>	0,05 % Tween 20 [®] (Roth, Karlsruhe, D) in PBS
<u>Blockpuffer:</u>	10 % FKS in PBS
<u>Standard:</u>	Rekombinantes Humanes IL-8 (BD Pharmingen)

<u>Detektion:</u>	Sekundärer Antikörper: biotinylierter Anti-Human-IL-8-mAk (Klon G 265-8, BD Pharmingen): 1 µg/ml in Blockpuffer
<u>Enzymreagenz:</u>	Avidin-HRP (BD Pharmingen) 1:1000 in Blockpuffer
<u>Substratreagenz:</u>	TMB 1:100 in Gallati-Puffer
<u>TMB:</u>	240 mg 3,3',5,5'-TMB (Fluka, Neu-Ulm, D) 5 ml DMSO (Sigma) 5 ml Ethanol
<u>Gallati-Puffer:</u>	0,034 % H ₂ O ₂ (Merck) in Zitrat-Puffer
<u>Zitrat-Puffer:</u>	33,6 g Zitronensäure-Monohydrat in 400 ml Aqua dest. lösen mit 4 N KOH auf pH 3,95 einstellen, mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
<u>Stopp-Lösung:</u>	1 M H ₃ PO ₄ (alles Merck)

3.3.2 ELISA zur Quantifizierung von ECP

Der ELISA zur Detektion von ECP wurde mithilfe eines handelsüblichen Kits (MBL, MoBiTec, Göttingen, D) nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Die im Kit enthaltenen 96-Mikrowellplatten waren bereits beschichtet und die Lösungen waren gebrauchsfertig oder wurden den Angaben entsprechend hergestellt. Das Detektionslimit dieses Kits lag bei 0,125 ng/ml.

***In vivo*-Modell**

Weibliche BALB/c wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, D) bezogen und waren bei Aufnahme 6-8-wöchig. Alle Versuche wurden in Erweiterung eines bestehenden Tierversuchsantrags (Reg G 0247/03) nach dem Deutschen Tierschutzgesetz vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt.

3.4 Futter

3.4.1 Supplementierte CLA-Öle

C9,*t*11-CLA-reiches Triazylglyzerol (Tab. 6, Abb. 13) wurde mit dem Verfahren der Umsetzung von Methylrizinolat (↑ 1.2.3.2) und das CLA-Mix-Präparat (Tab. 6, Abb. 13) durch basenkatalysierte Isomerisierung von Linolsäure auf der Basis von Färberdistelöl hergestellt (beides Cognis, Illertissen, D).

Tabelle 6: Fettsäurezusammensetzung der CLA-Präparate. GC-Analyse.

Fettsäure [% FSME]	c9, <i>t</i> 11-CLA- reiches TAG	CLA-Mix TAG
C14:0	0	0
C16:0	0,2	2,6
C18:0	0,5	2,8
C18:1 <i>c</i> 9	1,8	14,4
C18:1 <i>c</i> 11	0,3	0,7
C18:2 <i>n</i> 6	3,1	0,3
C18:3 <i>n</i> 3	0,2	0
C20:0	0,1	0
C20:1	0,5	0
C20:5 <i>n</i> 3	0,4	0
Σ CLA	86,6	78,0
Andere	6,7	1,4

Abkürzungen: FSME · Fettsäuremethylester, TAG · Triazylglyzerol

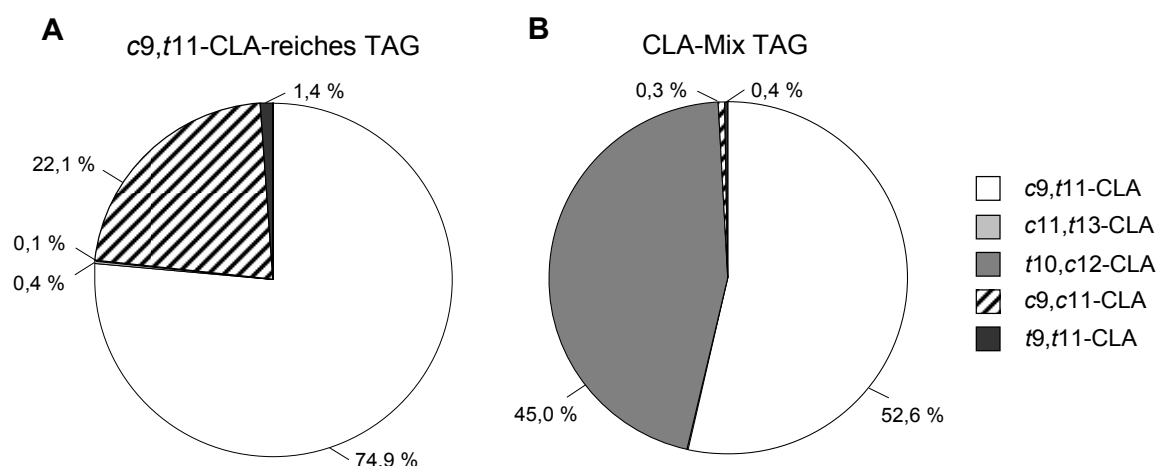


Abb. 13: Isomerenverteilung der CLA-Präparate. **A:** c9,t11-CLA-reiches TAG. **B:** CLA-Mix TAG. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an den Gesamt-CLA. HPLC-Analyse (↑ 9.5).

3.4.2 Fütterungsregime

Nach 5-tägiger Adaptation an die Haltungsbedingungen (22 °C, 12-stündiger Licht/Dunkel-Zyklus, max. 5 Tiere/Käfig im IVC-Regalsystem) wurden die Tiere randomisiert den Versuchsgruppen zugeordnet. Die Versuchsdiäten basierten auf der Erhaltungsdiät V1535 der Firma ssniff® (Soest, D) und waren Sonderbestellungen, die mit den jeweiligen Ölen angereichert wurden (Tab. 7).

Tabelle 7: Fettsäurezusammensetzung der Versuchsdiäten [g/kg].

	Basisfutter	Kontrolle Primäre Prävention	Kontrolle Sekundäre Prävention		c9,t11-CLA	CLA-Mix
Zugesetztes Öl		1,5 % Sonnenblumenöl	<u>d 0-16</u> 1,3 % Olivenöl	<u>d 16-32</u> 1,5 % Sonnenblumenöl	1,5 % c9,t11-CLA-reiches TAG	1,3 % CLA-Mix TAG
Fettsäure						
C14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:0	4,7	5,6	5,0	5,6	4,7	5,1
C18:0	0,8	1,4	1,2	1,4	0,9	1,2
C18:1c9	6,2	10,0	16,1	10,0	6,5	7,7
C18:2n6	18,0	27,8	18,8	27,8	18,4	18,3
c9,t11-CLA	0	0	0	0	9,9	5,0
c9,c11-CLA	0	0	0	0	2,9	0,1
t10,c12-CLA	0	0	0	0	0	4,9
C18:3n3	2,3	2,5	2,4	2,5	2,5	2,3
C20:0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
C20:4n6	0	0	0	0	0	0
Andere	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3

Dabei wurden die Konzentrationen der Öle so eingestellt, dass die Fettsäuren *c9,t11*-CLA bzw. die Summe aus *c9,t11*-CLA und *t10,c12*-CLA jeweils 1 % der Diät (w/w) entsprachen. Sonnenblumenöl ist, ähnlich der menschlichen westlichen Diät, reich an LA und wurde der Kontrolldiät als Referenzöl zugesetzt (Bombastus, Freital, D). Zum Ausgleich der kalorischen Bilanz über die Sensibilisierungsphase im Ansatz Sekundäre Prävention wurde LA-armes Olivenöl (Caelo, Hilden, D) gewählt. Die Supplementation der Kontrolldiäten mit den Referenzölen wurde entsprechend der jeweiligen Hauptfettsäure (1 % C18:2n6 bzw. 1 % C18:1c9 der Diät, w/w) adjustiert. Um oxidative und sensorische Veränderungen zu vermeiden, wurde das Futter in Portionen à 100 g luftdicht im Kühlschrank gelagert.

3.4.2.1 Primäre Prävention von allergischer Atemwegsentszündung

Um einen möglichen präventiven Effekt von CLA auf eine allergische Sensibilisierung zu evaluieren, begann die Gabe der *c9,t11*-CLA-angereicherten oder der mit Sonnenblumenöl supplementierten Kontrolldiät am Tag -7 vor der Sensibilisierung und dauerte weitere 32 Tage bis zum Versuchsende (Abb. 14 I).

3.4.2.2 Sekundäre Prävention von allergischer Atemwegsentszündung

Um zu untersuchen, ob ein protektiver Effekt von CLA auf die Entwicklung von allergischer Atemwegsentszündung und -hyperreaktivität in bereits sensibilisierten Tieren erwartet werden kann, begann die Fütterung von *c9,t11*-CLA bzw. der sonnenblumenölreichen Kontrolldiät nach der Sensibilisierung am Tag 16 des Protokolls. Über die Sensibilisierungsphase wurde allen Tieren eine mit Olivenöl supplementierte Diät verabreicht (Abb. 14 II).

3.4.2.3 Akkumulation und Metabolisierung von CLA

Naive Tiere bekamen entweder eine mit *c9,t11*-CLA oder eine mit einem CLA-Mix (Tab. 7) angereicherte Diät über einen Zeitraum von 39 Tagen. Als Kontrolle wurde eine sonnenblumenölreiche Diät über den gleichen Zeitraum gefüttert.

Die Veränderung des Körpergewichts wurde für jedes einzelne Tier jeden 3. Tag durch Wiegen (Sartorius, Göttingen, D) dokumentiert. Ebenfalls jeden 3. Tag bekamen die Tiere frisches, abgewogenes Futter und das bis dahin verbrauchte wurde rückgewogen. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.5 Immunisierung und Induktion von Atemwegsentszündung

Die Entwicklung einer lokalen allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge setzt eine systemische Sensibilisierung gegen das Allergen voraus, in deren Folge eine Th2-gewichtete Immunantwort ausgelöst wird. Der Sensibilisierungserfolg lässt sich später anhand des Titors allergenspezifischer Immunglobuline der Subklassen IgE und IgG1, die in einem Th2-assoziierten Zytokinmilieu gebildet werden, nachweisen.

An den Tagen 0 und 14 des Protokolls wurden die Tiere der Primären und Sekundären Präventionsmodelle durch intraperitoneale (i.p.) Injektion einer Emulsion (200 µl) aus Allergen (100 µg/ml Ovalbumin; OVA Grad VI; Sigma) und Adjuvans (10 mg/ml Al(OH)₃, Pierce, Rockford, IL) sensibilisiert (Abb. 14 I und II). Nach weiteren 14 Tagen erfolgte an 3 konsekutiven Tagen die jeweils 20-minütige inhalative Challenge mit einer OVA-Lösung (Grad V, 1 % in PBS), die mittels Ultraschall-Vernebler (Pari, Starnberg, D) aerosoliert und in eine dichte Kammer, in der die Mäuse saßen, geleitet wurde. Die Tiere der Kontrollgruppen wurden dem Protokoll entsprechend mit PBS scheinimmunisiert. Für Studien zum Mechanismus wurde einer immunisierten und mit *c9,t11*-CLA gefütterten Gruppe der selektive PPAR γ -Antagonist GW9662 20 min vor und während jeder Atemwegschallenge an den Tagen 28-30 inhalativ appliziert (20 µM in PBS; in Anlehnung an Woerly *et al.* 2003 und Honda *et al.* 2004; Abb. 14 I).

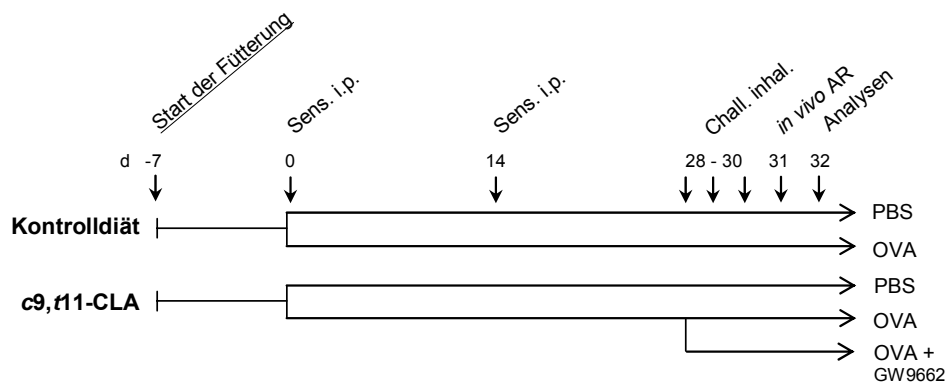
3.6 *In vivo*-Atemwegsreaktivität nach cholinenger Provokation

Die AR wurde durch barometrische Ganzkörper-Plethysmographie (WBP, Buxco, NY) ermittelt (Hamelmann *et al.* 1997). Diese nicht-invasive Methode erlaubt die Untersuchung der Lungenfunktion an spontan atmenden Tieren. Ein großer Vorteil gegenüber invasiven Systemen ist, dass die Tiere nicht anästhesiert und mechanisch beatmet werden müssen und Messwiederholungen am selben Tier möglich sind. Das Prinzip der WBP ist die Messung der Druckdifferenz zwischen der Hauptkammer, in der die Maus sitzt und atmungsbedingte Druckveränderungen erzeugt, und einer Referenzkammer mit konstantem Druck. Der berechnete Wert ist die »enhanced pause« (P_{enh}), ein dimensionsloser Parameter, der mit dem Atemwegswiderstand (Resistance) direkt korreliert.

Zunächst wurde ohne cholinerge Provokation die basale P_{enh} als Durchschnittswert über 3 min bestimmt. Anschließend wurden PBS und Metacholin (Sigma) in ansteigenden Konzentrationen (6 bis 50 mg/ml PBS) mittels Pari-Vernebler aerosoliert und für jeweils

3 min in die Hauptkammer geleitet. Nach jedem Schritt wurde die P_{enh} erneut gelesen und der Durchschnittswert über 3 min berechnet. Die Atemwegsreaktivität wurde als die relative Zunahme der P_{enh} nach jeder Mch-Konzentration im Vergleich zu den P_{enh} -Werten nach PBS-(Schein-) Provokation dokumentiert.

I Primäre Prävention



II Sekundäre Prävention

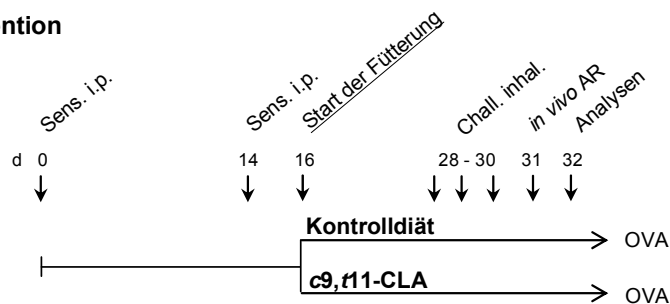


Abb. 14: Immunisierungs- und Fütterungsschemata der Primären und Sekundären Präventionsmodelle. **I:** Die Fütterung der c9,t11-CLA- bzw. der Kontrolldiät begann 7 Tage vor der Sensibilisierung und dauerte weitere 32 Tage. Am Tag 0 des Immunisierungsprotokolls wurden die Diätgruppen unterteilt und dem Protokoll entsprechend entweder mit OVA oder PBS behandelt. Einer mit c9,t11-CLA gefütterten und mit OVA behandelten Gruppe wurde 20 min vor und während jeder Challenge an den Tagen 28-30 der PPAR γ -Inhibitor GW9662 inhalativ appliziert. Am Folgetag wurde die Atemwegsreaktivität (AR) nach cholinergischer Provokation am lebenden Tier gemessen. Am Tag 32 wurden die Tiere für weitere Analysen getötet. **II:** Die Immunisierung mit dem Allergen erfolgte nach dem gleichen Schema wie **I**. Die Fütterung der c9,t11-CLA- bzw. der Kontrolldiät begann nach der Sensibilisierung am Tag 16.

Abkürzungen: AR · Atemwegsreaktivität, Chall. · Challenge, inhal. · inhalativ, i.p. · intraperitoneal, Sens. · Sensibilisierung

3.7 Zelldifferenzierung in der Bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die BAL dient zur Gewinnung von extravasierten peribronchialen Zellen, die anschließend nach einer Übersichtsfärbung differenziert werden können. Über einen trachealen Tubus und mithilfe einer 1-ml-Spritze (B. Braun, Melsungen, D) wurden die Lungen mit $2 \times 800 \mu\text{l}$ eiskaltem PBS mit zugesetztem Protease-Inhibitor (complete™ mini, Boehringer Mannheim, D; 1 Tablette/10 ml) gespült und die gewonnene BAL-Flüssigkeit sofort auf Eis gestellt. Nach Bestimmung des BAL-Volumens durch Wiegen und anschließender Zentrifugation (2200 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und bis zur Zytokinanalyse bei -80 °C gelagert. Die BAL-Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, gepoolt und gezählt. Anschließend wurden die Zellen aus 100 μl Probe durch Cytospin-Zentrifugation (Cytospin 4, Thermo Shandon, Frankfurt a. M., D) als Monolayer auf Objektträger aufgebracht und die Präparate über Nacht getrocknet. Nach DiffQuik®-Färbung (Dade Behring AG, Düringen, CH) wurde die prozentuale Verteilung der Zellen mikroskopisch durch Auszählen von jeweils 100 Zellen anhand morphologischer Kriterien ermittelt und die differenziellen Zellzahlen/ml BAL errechnet.

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Splenozytenproliferation

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden nach Präparation der Milzen durch Zerreiben des Gewebes durch ein Stahlsieb und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation (10 min, 1500 rpm, 20 °C) auf Lympholyte-M (Cedarline Lab., Hornby, CA) gewonnen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, in Kulturmedium (RPMI-1640 + Zusätze, ↑ 3.1.5) resuspendiert und bei 37 °C, 95 % rel. Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Um die Proliferation von Zellen sensibilisierter Tiere zu untersuchen, wurden 2×10^5 MNC in Triplikaten mit und ohne Zusatz von OVA (Grad VI, 10-100 $\mu\text{g/ml}$) in 96-Well-Platten für 3 Tage inkubiert, durch Zugabe von (³H)Thymidin (25 $\mu\text{l/well}$, 18,5 kBq/Well in PBS, Amersham Buchler, Braunschweig, D) gepulst und nach 24 h durch einen Zellharvester (Titertek, Lier, N) geerntet. Die Inkorporation von (³H)Thymidin wurde mittels Szintillationsmessung im β -Counter (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, D) bestimmt und der Stimulationsindex aus der proliferativen Reaktivität von OVA-stimulierten und unstimulierten Zellen berechnet.

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Bestimmung der mRNA-Expression von PPAR γ

Die Quantifizierung der Expression des Zielgens erfolgte mit Hilfe der TaqMan[®]-Technik für RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction)-Analyse. Bei dieser Technik werden die PCR-Produkte pro Amplifikationszyklus, also in »real time«, hochspezifisch mittels fluoreszierender Sonden nach dem Prinzip der strahlungsfreien Energieübertragung (Förster resonance energy transfer) quantifiziert: die Fluoreszenz eines Donor-Fluorochroms (Reporter) am einen Ende der Sonde wird durch ein Akzeptor- bzw. Quencher-Fluorochrom am anderen Ende abgefangen. Bei jedem Amplifikationszyklus wird die mit der Target-DNA hybridisierte Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgespalten, wodurch sich Donor- vom Akzeptor-Fluorochrom entfernt und der Energietransfer zwischen beiden unterbrochen wird. Das Fluoreszenzsignal des Quenchers nimmt ab während das des Reporters zunimmt und gemessen wird.

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Lungengewebe wurde der Invisorb[®]-Kit (Invitex, Berlin, D) verwendet. Proben der rechten Lungenlappen wurden in Lysepuffer mittels Ultra-Turrax (IKA) homogenisiert und dem Protokoll entsprechend bearbeitet. Anschließend wurden die Konzentration und Qualität der extrahierten RNA bestimmt (\uparrow 3.2.1.1). Die Genexpression von PPAR γ wurde in einer one-step RT-qPCR über β -Actin normalisiert quantifiziert.

Tabelle 8: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von PPAR γ .

	Volumen pro 100 Reaktionen [μl]	Endkonzentration	Bezugsquelle
Taqman [®] Universal Mastermix	2200		Applied Biosystems, Mannheim, D
PPAR γ FW (100 μM)	15	300 nM	BioTez, Berlin-Buch, D
PPAR γ RV (100 μM)	15	300 nM	BioTez
PPAR γ Sonde (100 μM)	5	100 nM	MWG Biotech, Ebersberg, D
β -Actin FW (100 μM)	1	20 nM	BioTez
β -Actin RV (100 μM)	1	20 nM	BioTez
β -Actin Sonde (100 μM)	5	100 nM	MWG Biotech
RNasin (40 U/μl)	25	10 U	Promega, Mannheim, D
MMLV-H (200 U/μl)	5	10 U	Promega
DEPC-H ₂ O	1728		

Tabelle 9: Verwendete Primer und Sonden zur Amplifikation von PPAR γ .

Gen		Nukleotidsequenz
PPAR γ	Primer FW	5'-TAA CTG CCG GAT CCA CAA A-3'
	Primer RV	5'-ATC TCC GCC AAC AGC TTC T-3'
	Sonde	5'fam-CTG TCG GTT TCA GAA GTG CCT TGC-3'tam
β -Actin	Primer FW	5'-GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC A-3'
	Primer RV	5'-GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA-3'
	Sonde	5'vic-CCA TGT ACG TAG CCA TCC AGG CTG TG-3'tam

10 μ l Template (100 ng) wurden zu 40 μ l des optimierten Reaktionsansatzes pipettiert (Tab. 8) und in Triplikaten auf optischen 96-Well-Platten (ABgene, Epsom, UK) im Real Time PCR-System (Applied Biosystems) unter Verwendung von folgendem Temperaturprogramm analysiert:

Tabelle 10: Temperaturprogramm zur Amplifikation von PPAR γ .

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
48	30 min	1×
95	10 min	1×
95	15 s	40×
60	1 min	

Als interner Standard wurde bei jedem Lauf eine Verdünnungsserie von aus LA-4-Zellen extrahierter Gesamt-RNA eingeschlossen.

3.10 Proteinbiochemische Methoden

3.10.1 ELISA zur Bestimmung von IL-5 in der BAL

Durchführung des ELISA: ↑ 3.3.1

Zusammensetzung der Lösungen:

Coating: Primärer Antikörper:
Anti-Maus-IL-5-mAk (Klon TRFK5, BD Pharmingen):
2 μ g/ml in Coating-Puffer

Coating-Puffer: 8,4 g NaHCO₃, in 1 l Aqua dest. lösen,
mit 10 N NaOH auf pH 8,2 einstellen

Waschpuffer: 0,05 % Tween 20[®] in PBS

- Blockpuffer: 3 % BSA (Serva, Heidelberg, D) in PBS
- Standard: Rekombinantes Maus IL-5 (BD Pharmingen)
- Detektion: Sekundärer Antikörper:
biotinylierter Anti-Maus-IL-5-mAk (Klon TRFK4, BD Pharmingen):
1 µg/ml in Blockpuffer
- Enzymreagenz: Avidin-HRP 1:1000 in Blockpuffer
- Substratreagenz: TMB 1:100 in Gallati-Puffer (↑ 3.3.1)
- Stopp-Lösung: 0,1 M H₂SO₄

Die Nachweisgrenze betrug 4 ng/ml.

3.10.2 ELISA zur Bestimmung der Immunglobulin-Plasmatiter

Unmittelbar vor der Tötung durch zervikale Dislokation wurde Blut aus der Schwanzvene in EDTA-Röhrchen entnommen, bei 10.000 rpm 10 min zentrifugiert und anschließend das Plasma getrennt von den korpuskulären Blutbestandteilen bei -80 °C gelagert. Die Plasmatiter von spezifischem IgG1 und IgG2a wurden in einem indirekten ELISA bestimmt, bei dem die Mikrotiterplatten anstelle eines primären Antikörpers (so wie bei Gesamt- und spezifischem IgE) mit dem Allergen beschichtet wurden. Standards von OVA-IgE und OVA-IgG2a wurden durch Titration der Seren systemisch immunisierter BALB/c erhalten. Ihre Konzentrationen wurden als ELISA Units (EU)/ml definiert.

Zusammensetzung der Lösungen:

- Coating: Gesamt-IgE: Anti-Maus-IgE-mAk (Klon R35-92; BD Pharmingen)
2 µg/ml in Coating-Puffer
- OVA-IgE: Anti-Maus-IgE-mAk (Klon R35-72; BD)
4 µg/ml in Coating-Puffer
- OVA-IgG1 und -IgG2a: OVA Grad VI (Sigma)
10 µg/ml in PBS, pH 7
- Coating-Puffer: 8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃ in 1 l Aqua dest. lösen,
mit 10 N NaOH auf pH 9,5 einstellen (alles Merck)
- Waschpuffer: 0,05 % Tween 20[®] in PBS
- Blockpuffer: 3 % BSA in PBS
- Standard: Gesamt-IgE: Maus IgE κ Isotypkontrolle (Klon C38-2; BD)
- OVA-IgG1: Ovalbumin mAk (Klon OVA-14; Sigma)
- OVA-IgE, und -IgG2a: Serum aus OVA-immunisierten BALB/c

Detektion: Gesamt-IgE: biotinylierter Anti-Maus-IgE-mAk (Klon R35-72; BD)
 2,5 µg/ml in Waschpuffer
 OVA-IgE: OVA-Biotin[†]
 6 µg/ml in Waschpuffer
 OVA-IgG1: biotinylierter Anti-Maus-IgG1-mAk (Klon A85-1; BD)
 0,5 µg/ml in Waschpuffer
 OVA-IgG2a: biotinylierter Anti-Maus-IgG2a-mAk (Klon R19-15; BD)
 2,5 µg/ml in Waschpuffer

Enzymreagenz: Avidin-HRP 1:1000 in Blockpuffer

Substratreagenz: TMB 1:100 in Gallati-Puffer (↑ 3.3.1)

Stopp-Lösung: 0,1 M H₂SO₄

Das Detektionslimit lag für Gesamt-IgE bei 2 ng/ml, für OVA-IgE bei 10 EU/ml, für OVA-IgG1 bei 0,4 ng/ml und für OVA-IgG2a bei 1,4 EU/ml.

3.11 Untersuchung der Organe

3.11.1 Histologie der Lungen

3.11.1.1 Periodsäure Schiff-Färbung

Die Periodsäure Schiff (PAS)-Färbung ist eine histochemische Standardfärbetechnik zum Nachweis von (Mukopoly-)Sacchariden, indem deren freie Hydroxylgruppen durch die Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden, die dann das Fuchsin im schwefelsauren Schiff'schen Reagenz komplexieren (Hotchkiss 1948).

Vor der Entnahme der Lunge wurde der rechte Lungenlappen an der Bifurkation der Bronchien abgebunden und die linken Lappen durch Perfusion der rechten Herzkammer mit ca. 5 ml PBS blutleer gespült. Anschließend wurden die linken Lungenlappen resektiert, in Tissue Tek[®] (Sakura, Zoeterwonde, NL) eingebettet und zunächst in Flüssigstickstoff, anschließend bei -80 °C tiefgefroren. Die Anfertigung von Gefrierschnitten der unteren, mittleren und oberen Atemwege erfolgte an einem Schlitten-Mikrotom (Leica, Nussloch, D). 4-µm dicke Gewebeschnitte wurden auf SuperFrost[®]-Objektträger (Menzel, Braunschweig, D) gezogen, luftgetrocknet und zur Detektion von Mukopolysaccharid-Akkumulation mit PAS-Technik nach folgendem Protokoll gefärbt:

[†] OVA-Biotin: 1,5 mg OVA VI
 1,5 ml PBS/0,05 % NaN₃
 150 µl 1 M NaHCO₃
 30 µl 13,4 M Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in Aqua dest.

1.	0,5 % Periodsäure	8 min	
2.	Aqua dest.	2 min	
3.	Schiff'sches Reagenz	8 min	
4.	Leitungswasser fließend	1 min	
5.	Hämalaun nach Mayer	3 min	
6.	Leitungswasser fließend	3 min	
7.	70 % Ethanol	2 min	
8.	96 % Ethanol	2 min	
9.	100 % (v/v) Ethanol	2 × 2 min	
10.	Xylol	2 × 2 min	(alles von Merck)

Anschließend wurden die Schnitte mit Vitro-Clud[®] (R. Langenbrink, Emmendingen, D) eingedeckt.

3.11.1.2 Histologische Beurteilung

Zur Beurteilung der histologischen Veränderungen in den Lungen wurden die gefärbten Gewebeschnitte lichtmikroskopisch begutachtet und mit einem Score von 0 (= keine Veränderungen) bis 3 (= starke Veränderungen) folgendermaßen bewertet:

Tabelle 11: Semiquantitativer PAS-Score.

Histologische Veränderung	Bewertung	Score			
		0	1	2	3
Bercherzell-Hyperplasie	Becherzellen pro Bronchiole	keine	≤ 25 %	> 25 % ≤ 50 %	> 50 %
Mukusakkumulation	PAS-positive Zellen	keine	wenig	mittel	viel
Inflammation	peribronchiale Infiltrate	≤ 15 %	> 15 % ≤ 30 %	> 30 % ≤ 50 %	> 50 %

Pro Tier wurden 20 Bronchiolen ausgewertet.

3.11.2 Fettsäurenanalytik

3.11.2.1 Lipidextraktion

Das Gesamtfett wurde aus Leber, Abdominalfett, Lunge, Milz und Erythrozyten nach einer leicht modifizierten Methode von Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Dazu wurden die Organproben mittels Ultra-Turrax in 4 ml Methanol homogenisiert und im Ultraschallbad (Sonorex, Wiesloch, D) tropfenweise mit 2 ml Chloroform versetzt. Nach 30 min Schütteln und anschließender Zugabe von 2 ml 2 %ige Natriumchlorid-Lösung und 2 ml Chloroform wurden die Proben erneut 30 min geschüttelt und zur Phasentrennung 7 min bei 3300 rpm

zentrifugiert. Die untere Phase wurde über ein Säulchen (eine mit Glaswolle und 0,5 g Natriumsulfat gefüllte Pasteurpipette) in ein vorgewogenes Pyrex-Röhrchen filtriert und im N₂-Strom eingengt (Probenkonzentrator DB3A: Techne, Jahnsdorf, D). Der Lipidextrakt wurde rückgewogen, in einer definierten Menge *n*-Hexan gelöst und bei -80 °C gelagert.

3.11.2.2 *Derivatisierung*

Um Fettsäuren gaschromatographisch trennen zu können, müssen sie zunächst aus dem Triazylglyzerol hydrolysiert und anschließend reverestert werden. Eine Standardmethode in der Fettsäurenanalytik ist die basenkatalysierte Derivatisierung der Fettsäuren in ihre Methylester (FSME). Bei der Analyse von CLA sollte eine basische Methylierung aufgrund der möglichen Artefaktbildung unter sauren Bedingungen vorgezogen werden (Kramer *et al.* 1997).

2 mg Lipidextrakt wurden in 2,5 ml *n*-Hexan aufgenommen, mit 0,5 ml Natrium-Methylat (Acros Organics/Fisher Scientific, Nidderau, D) versetzt und zunächst für 15 min im Ultraschallbad und anschließend 10 min im 60 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dann wurde eine Spatelspitze Natriumhydrogensulfat-Monohydrat (Roth) zugegeben, geschüttelt und 10 min bei 3600 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, im N₂-Strom getrocknet und mit 800 µl Methanol + 200 µl TMG (Sigma) für 5 min bei 100 °C inkubiert. Nach Abkühlen unter fließend kaltem Wasser wurden die Proben mit 2 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung und 2 ml *n*-Hexan versetzt, geschüttelt und 10 min bei 3600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase über ein Säulchen (↑ 3.11.2.1) in ein frisches vorgewogenes Röhrchen überführt und die Proben noch zweimal mit je 1 ml *n*-Hexan extrahiert. Die vereinten Extrakte wurden eingengt, rückgewogen und in 200 µl *n*-Hexan aufgenommen.

3.11.2.3 *Dünnschicht-Chromatographie*

Zur Aufreinigung der FSME erfolgte anschließend die Fraktionierung der Extrakte auf Dünnschicht-Kieselgelplatten (60 F254, 20 × 20 cm; Merck) mit einem Elutionsgemisch aus *n*-Hexan/Diethylether/Eisessig (85/15/1, v/v/v). Die Laufkammer wurde mit 100 ml Fließmittelgemisch befüllt und für 1 h geschlossen konditioniert. Zwischenzeitlich wurden die Proben mit einer Glasspritze (Hamilton, Bonaduz, CH) auf die Platten neben einen geeigneten Standard aufgetragen. Die Platten wurden 45 min zur chromatographischen Trennung der Fraktionen aufrecht in die Kammer gestellt. Anschließend wurden die getrockneten Platten mit 0,2 %iger Dichlorfluorescein-Lösung (Roth) besprüht und die

FSME-Banden anhand des Standards unter UV-Licht (254 nm) detektiert und markiert. Mithilfe spezieller Schaber wurden die Banden vorsichtig von der Platte gekratzt und in sauberen Röhrchen gesammelt. Die FSME wurden aus der Kieselgelmatrix mit 4 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Chloroform/*n*-Hexan (1/1, v/v) gelöst, über eine mit Glaswolle und Kieselgel gefüllte Pasteurpipette in ein vorgewogenes Röhrchen gespült, im N₂-Strom eingengt, rückgewogen und in 300 µl *n*-Hexan aufgenommen.

3.11.2.4 Gas-Chromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

Die Trennung der FSME erfolgte in einem Gas-Chromatographen (GC 17a V3, Shimadzu, Kyoto, J) unter Verwendung einer Kapillarsäule mit einer relativen Polarität von 42 % (DB 225 MS, 60 m × 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke; J & W Scientific, Folsom, USA). Diese Säule erlaubte die Trennung von FSME mit Kettenlängen von C4 bis C26 sowie die Separation der CLA-Hauptisomeren (mit Einschränkung; ↑ 5.4.2, 9.5). Die GC-Konditionen waren wie folgt: Trägergas H₂, Säulenfluss 1,5 ml/min, lineare Geschwindigkeit 42 cm/s, Injektionsmodus Split 1:20, Injektionsfluss 150 ml/min, Injektortemperatur 260 °C, Temperaturprogramm: 2 min isotherm bei 70 °C, Anstieg um 10 °C/min auf 180 °C, für 5 min um 2 °C/min auf 220 °C, für 7 min um 2 °C/min auf 230 °C, Detektortemperatur 270 °C. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisator und die Auswertung mithilfe der Software GC Solution Version 2.3 (Shimadzu).

3.12 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus mindestens 4 Wiederholungen der *in vitro*-Stimulationsansätze in Duplikaten bzw. mindestens 6 Tieren pro Gruppe angegeben. Der *in vivo*-Ansatz Primäre Prävention wurde einmal wiederholt. Die beschreibende statistische Auswertung wurde mit Excel 2003 und die explorativen Verfahren mit SPSS 11.0 für Windows durchgeführt. Die Daten der *in vitro*-Experimente wurden nicht-parametrisch mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test für zwei verbundene Stichproben verglichen. Die Daten des Primären Präventionsansatzes der Tierstudie wurden nach Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest) mit 2 × 2-faktorieller Varianzanalyse ausgewertet, um die Haupt- sowie Interaktionseffekte der Diäten (c9,t11-CLA vs. Kontrolle) und der Immunisierung (OVA vs. PBS) zu erfassen. Für multiple Vergleiche wurde der Student-Newman-Keuls post hoc Test angewandt. Es wurden für keinen der analysierten Parameter Interaktionseffekte der Faktoren festgestellt, außer für die mRNA-Expression von PPARγ in der murinen Lunge (p = 0,05; 2-Wege-Interaktion

ANOVA). Weil für diesen Parameter nur die Haupteffekte der Diäten interpretierbar waren, wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels ungepaarten Student's T-Tests bestimmt. Die Auswertung der P_{enh} -Kurven erfolgte mit ANOVA für Messwiederholungen. Der Vergleich der *c9,t11*-CLA OVA-Gruppen mit und ohne GW9662 wie auch der Daten des Sekundären Präventionsansatzes sowie der Gewebekonzentrationen der Fettsäuren wurde mit univariater Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Einflüsse der Diäten auf die Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Organe wurden mittels Korrelationsanalyse evaluiert. Die Schwelle für Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p \leq 0,05$) angesetzt.

4 Ergebnisse

Teil I - Immunologie

In vitro-Modell

4.1 Effekte in BEAS-2B

4.1.1 IL-8 Produktion auf Proteinebene

Nach 24-stündiger Stimulation der BEAS-2B mit LPS und Serum von allergischen Spendern wurden 796 ± 53 pg IL-8/ml Kulturüberstand gemessen. Präinkubation der Zellen mit *c9,t11*-CLA reduzierte den stimulusinduzierten Anstieg der IL-8-Produktion um 34 ± 6 % ($p \leq 0,05$ vs. Kontrolle ohne FS, Abb. 15). Auch durch Präinkubation mit LA konnte eine tendenzielle Reduktion der IL-8-Sezernierung beobachtet werden (-17 ± 4 % vs. Kontrolle, $p = 0,068$). Allerdings war die Hemmung durch *c9,t11*-CLA signifikant stärker als die durch LA ($p \leq 0,05$ vs. LA). Wurden die Kulturen vor *c9,t11*-Zugabe mit GW9662 zur Inhibition von PPAR γ präinkubiert, waren keine Hemmeffekte der Fettsäuren festzustellen bzw. wurden aufgehoben ($p \leq 0,05$ vs. *c9,t11*-CLA). Coadministration von GW9662 in den Kontrollkulturen zeigte keine eigenen Effekte des Inhibitors.

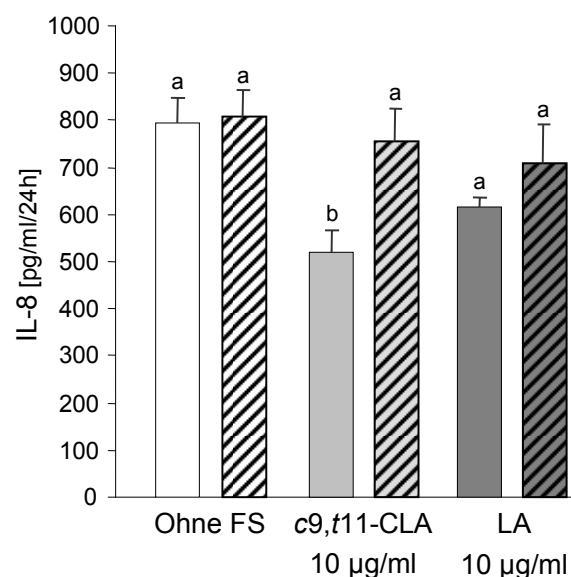


Abb. 15: IL-8-Sezernierung in BEAS-2B. Alle Kulturen wurden 24 h mit LPS und Serum stimuliert. Die Fettsäuren(FS)-Intervention erfolgte 1 h vor und während der Stimulation. Schraffiert: Kulturen wurden vor Zugabe der FS 30 min mit dem selektiven PPAR γ -Inhibitor GW9662 präinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben: $a > b$, $p \leq 0,05$.

4.1.2 IL-8-Produktion auf mRNA-Ebene

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der IL-8-Produktion auf Genebene stattfand, wurde die spezifische mRNA-Expression bestimmt. BEAS-2B, die mit LPS und Serum von allergischen Spendern inkubiert wurden, exprimierten nach 8 h spezifische IL-8-mRNA (Abb. 16A). Präinkubation mit LA bewirkte eine leichte Reduktion der IL-8-Expression ($-9 \pm 10 \%$ vs. Kontrolle ohne FS, n.s.). Im Gegensatz dazu exprimierten die Zellen, die vor der Stimulation mit *c9,t11*-CLA präinkubiert wurden, signifikant weniger IL-8-mRNA als in der fettsäurefreien Kontrolle ($-37 \pm 5 \%$; $p \leq 0,05$; Abb. 16A). Diese Hemmung war ebenfalls signifikant gegenüber dem LA-Ansatz ($p \leq 0,05$). Durch Präinkubation der mit *c9,t11*-CLA supplementierten Zellen mit dem Rezeptorblocker GW9662 wurde der hemmende Effekt von *c9,t11*-CLA auf die stimulusinduzierte IL-8-mRNA-Expression verhindert bzw. aufgehoben ($p \leq 0,05$ vs. *c9,t11*-CLA).

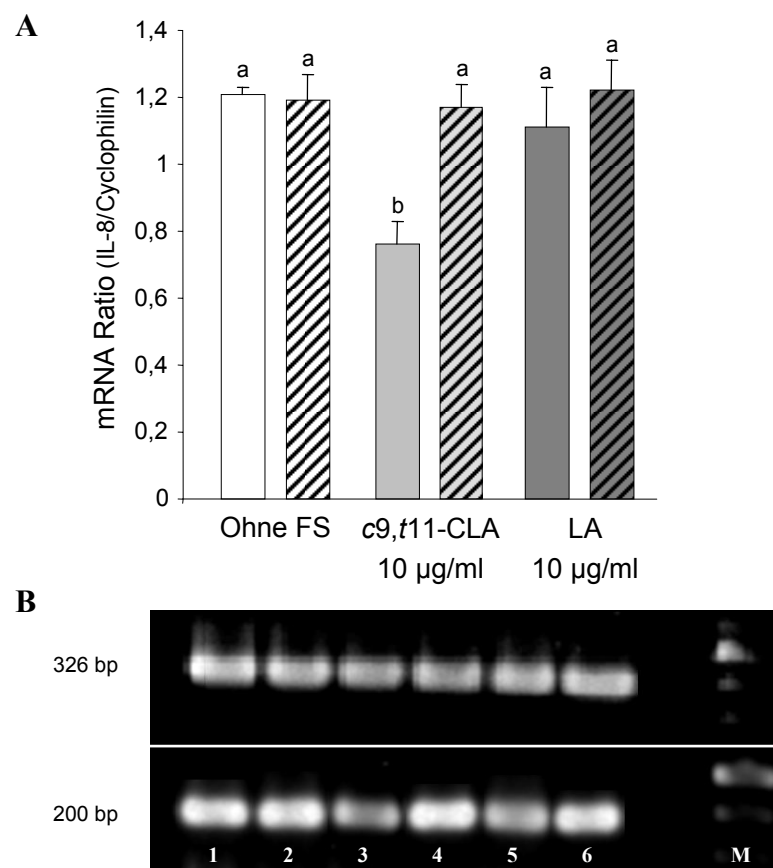


Abb. 16: IL-8-mRNA-Expression in BEAS-2B. Alle Kulturen wurden 8 h mit LPS und Serum stimuliert. **A:** Schraffiert: Kulturen wurden mit dem selektiven PPAR γ -Inhibitor GW9662 präinkubiert. FS · Fettsäuren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben: $a > b$, $p \leq 0,05$. **B:** Repräsentatives Gel. Die Konzentrationsbestimmung der IL-8-mRNA-Amplifikate (200 bp) erfolgte densitometrisch in Referenz zu Cyclophilin (326 bp), 1 - Kontrolle ohne FS, 2 - Kontrolle ohne FS + GW9662, 3 - *c9,t11*-CLA, 4 - *c9,t11*-CLA+GW9662, 5 - LA, 6 - LA+GW9662, M - 100 bp Leiter

In allen mit GW9662 präinkubierten Kulturen lag die Konzentration der IL-8-mRNA auf dem Level der Kontrolle. Somit hatte die Exposition der Zellen mit dem PPAR γ -Inhibitor keinen eigenen stimulierenden oder hemmenden Effekt auf die IL-8-mRNA-Expression.

4.2 Effekte in Eosinophilen

4.2.1 Vitalität

Die Überlebensrate von eosinophilen Granulozyten aus dem Blut von allergischen Spendern wurde mittels PI-Exklusionsmethode durchflusszytometrisch gemessen. Unmittelbar nach der Isolation und Aufreinigung betrug die Vitalität der Eosinophilen $> 99\%$ (nicht dargestellt). Ohne Zytokinstimulation überlebten nach 19-stündiger[‡] Inkubation $72 \pm 5\%$ der Zellen im Kontrollansatz, in Gegenwart von *c9,t11*-CLA lag die Rate mit $75 \pm 5\%$ leicht darüber (Abb. 17 links). Wurden die Eos mit IL-5 oder IL-5 + TNF- α 18 h lang inkubiert, stieg ihre Überlebensrate sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von *c9,t11*-CLA auf jeweils $87 \pm 2\%$ ($p \leq 0,05$ für IL-5, Abb. 17 Mitte) bzw. $85 \pm 2\%$ ($p \leq 0,05$ für IL-5 + TNF- α , Abb. 17 rechts). Die Supplementation der stimulierten Zellen mit *c9,t11*-CLA hatte somit keinen Einfluss auf die Vitalität innerhalb des Inkubationszeitraums.

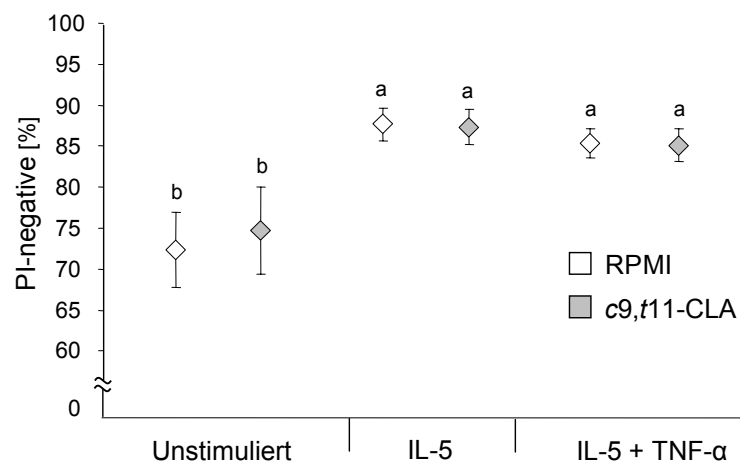


Abb. 17: Vitalität der Eosinophilen. Die Intervention mit *c9,t11*-CLA erfolgte 1 h vor und während der 18-stündigen Stimulation. Dargestellt sind MW \pm SEM der PI-negativen Zellen in %. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben: $a > b$, $p \leq 0,05$.

[‡] Kontrolle zu *c9,t11*-CLA: 1 h Präinkubation vor Zugabe der Zytokine

4.2.2 CD69-Expression

Auf naiven Eosinophilen, die in Medium allein oder mit Zusatz von *c9,t11*-CLA inkubiert wurden, war immunzytochemisch kein CD69 nachweisbar, wie die spezifische mittlere Fluoreszenz (SMF) von $0,2 \pm 0,1$ (RPMI) und $0,1 \pm 0,1$ (*c9,t11*-CLA) zeigt (Abb. 18 links). Nach 18-stündiger Stimulation mit IL-5 oder IL-5 + TNF- α stieg die CD69-Expression in der fettsäurefreien Kultur um das 12- bzw. 14,5-fache an ($p \leq 0,001$). Im Vergleich zur stimulierten Kontrolle wurde 29 ± 11 % bzw. 38 ± 7 % weniger CD69-abhängige SMF gemessen, wenn die Zellen 1 h vor und während der Stimulation mit *c9,t11*-CLA inkubiert wurden ($p \leq 0,05$ für IL-5, Abb. 18 Mitte; $p \leq 0,05$ für IL-5 + TNF- α , Abb. 18 rechts).

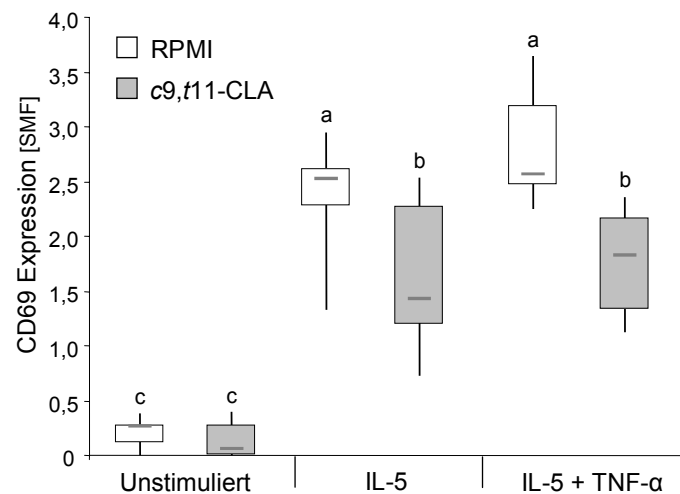


Abb. 18: Expression von CD69 auf Eosinophilen. Die Intervention mit *c9,t11*-CLA erfolgte 1 h vor und während der 18-stündigen Stimulation. Dargestellt sind Boxplots der CD69-spezifischen mittleren Fluoreszenz (SMF). Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b > c$, $p \leq 0,05$.

4.2.3 CD13-Expression

Die basale CD13-Expression wurde durch *c9,t11*-CLA-Zugabe nicht beeinflusst ($SEM = 1,3 \pm 0,1$ für *c9,t11*-CLA vs. $1,4 \pm 0,1$ für RPMI; Abb. 19 links). Nach 18-stündiger Stimulation der Eosinophilen mit IL-5 oder IL-5 in Kombination mit TNF- α stieg die CD13-Expression signifikant auf das Doppelte bzw. 2,4-fache an ($p \leq 0,01$). *C9,t11*-CLA-Intervention 1 h vor und während der Stimulation reduzierte den Anstieg der CD13-Expression um 26 ± 5 % bzw. 18 ± 7 % ($p \leq 0,05$ für IL-5, Abb. 19 Mitte; $p \leq 0,05$ für IL-5 + TNF- α , Abb. 19 rechts).

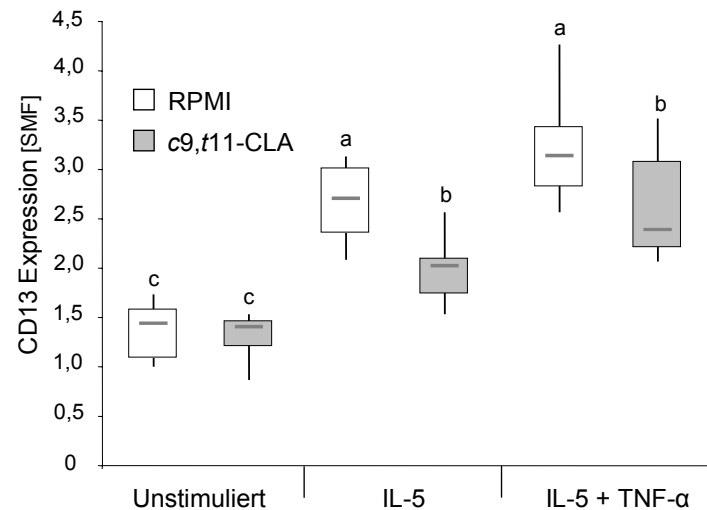


Abb. 19: Expression von CD13 auf Eosinophilen. Die Intervention mit *c9,t11*-CLA erfolgte 1 h vor und während der 18-stündigen Stimulation. Dargestellt sind Boxplots der CD13-spezifischen mittleren Fluoreszenz (SMF). Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b > c$, $p \leq 0,05$.

4.3 ECP-Freisetzung in der Co-Kultur

Die Konzentration von spontan gebildetem ECP im Überstand der Co-Kultur von BEAS-2B und Eosinophilen wurde durch *c9,t11*-CLA-Zugabe nicht beeinflusst (Abb. 20).

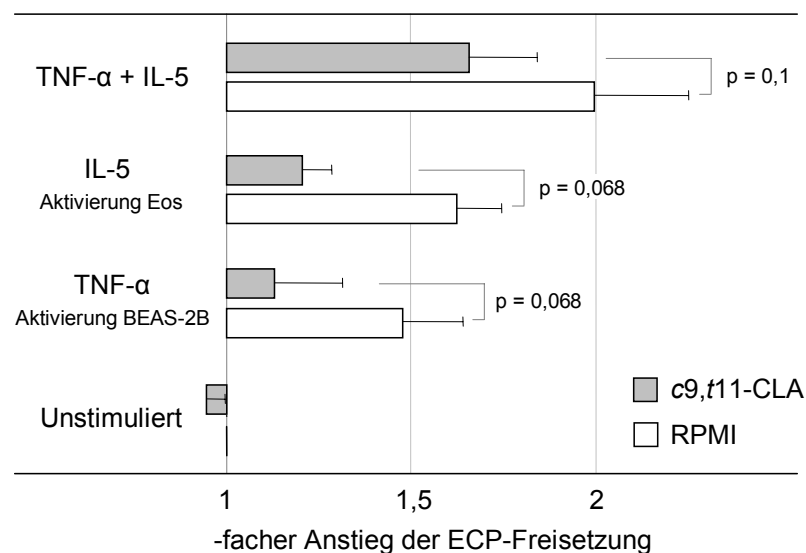


Abb. 20: ECP-Freisetzung in der Co-Kultur von BEAS-2B und Eosinophilen. Stimulation (v. u. n. o.): ohne; 24 h Präinkubation der BEAS-2B mit TNF-α vor Zugabe von *c9,t11*-CLA und Eos; 18-stündige Inkubation der Co-Kultur mit IL-5; Präinkubation der BEAS-2B mit TNF-α und Inkubation der Co-Kultur mit IL-5.

Sowohl durch 24-stündige Präinkubation der BEAS-2B mit TNF- α als auch durch Stimulation mit IL-5 während der 18-stündigen Co-Kultur stieg die Konzentration von ECP im Überstand im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant an ($p \leq 0,01$; Abb. 20). Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle verdoppelte sich der ECP-Gehalt im Überstand in Gegenwart von TNF- α + IL-5 ($p \leq 0,01$). Im Gegensatz zur stimulierten Kontrolle wurde im mit TNF- α präinkubierten und *c9,t11*-CLA supplementierten Ansatz 24 ± 9 % weniger ECP detektiert ($p = 0,068$). Auch nach Stimulation mit IL-5 stieg die Konzentration an ECP durch *c9,t11*-CLA-Supplementation um 25 ± 10 % weniger an als in der stimulierten Kontrolle ($p = 0,068$). Wurde die Co-Kultur von Eosinophilen und prästimulierten BEAS-2B in Gegenwart von IL-5 mit *c9,t11*-CLA inkubiert, konnte die ECP-Freisetzung um 18 ± 5 % reduziert werden ($p = 0,1$).

In vivo-Modell

4.4 Akkumulation von *c9,t11*-CLA in der Lunge

Zunächst sollte geprüft werden, ob das nahrungssupplementierte *c9,t11*-CLA in der murinen Lunge akkumuliert. Dazu wurde das Fettsäurespektrum der Lungen gaschromatographisch analysiert. Die Konzentration von *c9,t11*-CLA stieg in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer nach 16 Tagen auf $1,1 \pm 0,1$ % (Abb. 21 II, Sekundäre Prävention) bzw. nach 39 Tagen auf $2,0 \pm 0,1$ % (Abb. 21 I, Primäre Prävention) der Gesamt-FSME an.

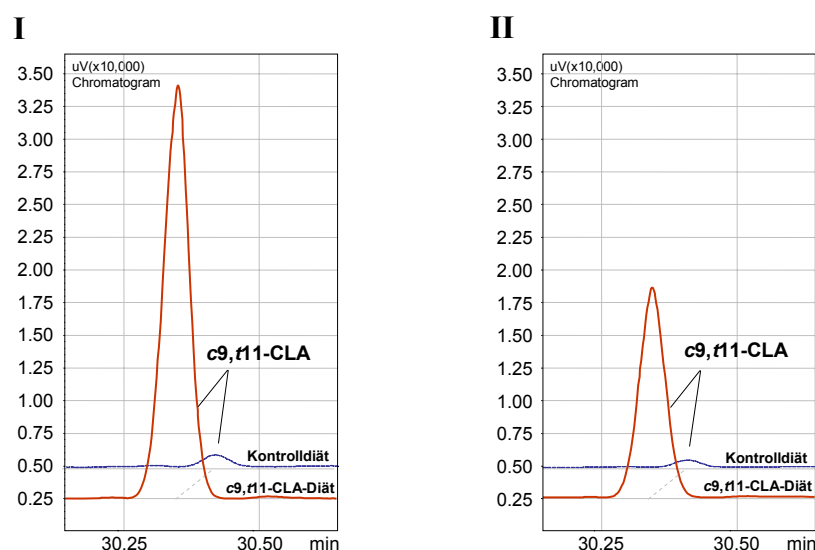


Abb. 21: Peakflächen von *c9,t11*-CLA in der murinen Lunge. **I:** Den Tieren wurde für die Dauer von 39 Tagen (**I**) bzw. 16 Tagen (**II**) eine *c9,t11*-CLA-angereicherte (1 % w/w; rot) oder eine Kontrolldiät (blau) gefüttert. Dargestellt sind Ausschnitte von repräsentativen Chromatogrammen.

In den Lungen der Kontrolltiere beider Ansätze lag der Anteil von *c9,t11*-CLA bei $< 0,1$ % der FSME ($p < 0,001$ vs. *c9,t11*-CLA-Diät).

4.5 Humorale Immunantwort

Primäre Prävention

Nach systemischer Sensibilisierung stiegen die Plasmatiter von Gesamt-IgE, allergenspezifischem IgE und -IgG1 sowie -IgG2a in beiden Diätgruppen signifikant an (Haupteffekt der Immunisierung: $p < 0,001$; Abb. 22 IA-D). Allerdings bildeten die immunisierten Tiere der *c9,t11*-CLA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe 33 ± 5 % weniger Gesamt-IgE (Haupteffekt der Diät: $p = 0,034$; Abb. 22 IA). Die Reduktion der Titer von OVA-spezifischen Antikörpern war deutlich für IgE (-42 ± 14 %, n.s.; Abb. 22 IB) und signifikant für IgG1 (-31 ± 9 %, $p = 0,048$; Abb. 22 IC) und IgG2a (-75 ± 7 %, $p = 0,018$; Abb. 22 ID).

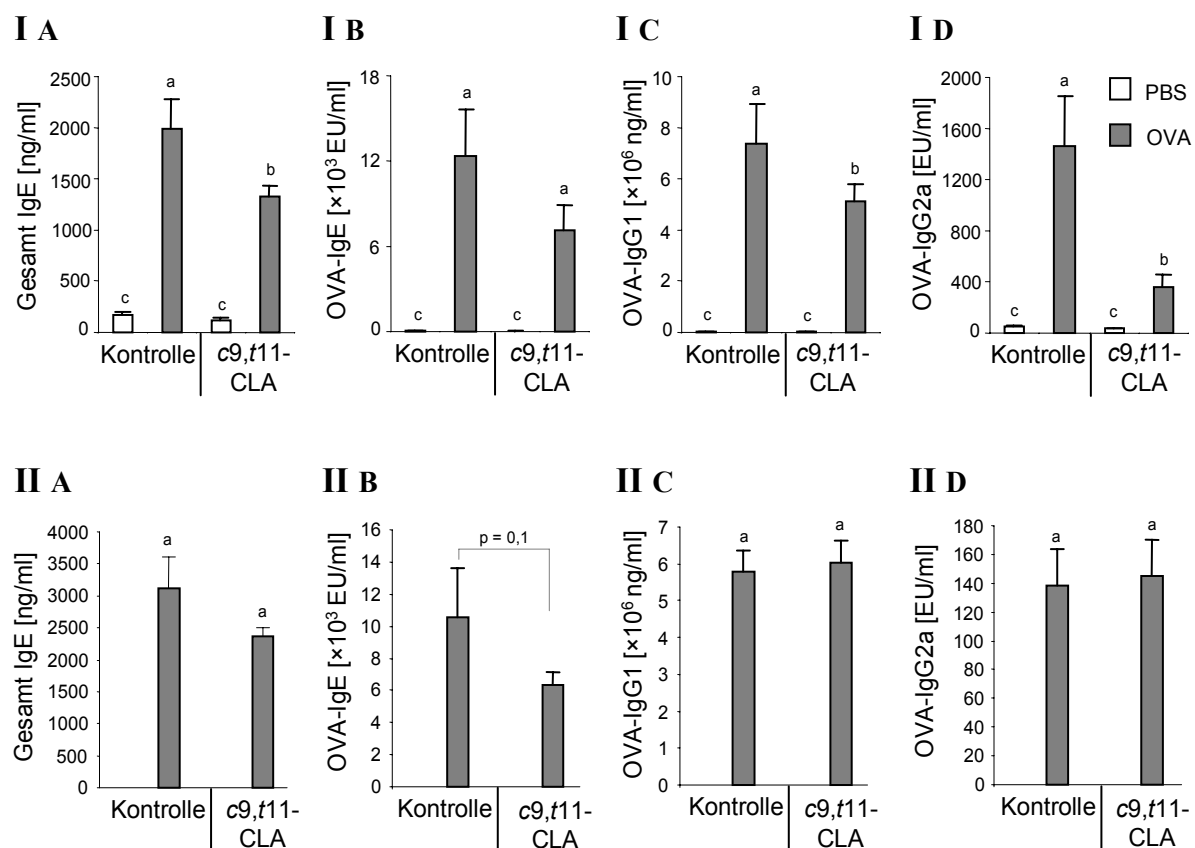


Abb. 22: Immunglobulin-Plasmatiter. **I:** Primärer Präventionsansatz – Die Fütterung der Diäten (1 % *c9,t11*-CLA w/w der Diät oder Kontrolle) begann 7 Tage vor der Sensibilisierung und dauerte weitere 32 Tage über den Zeitraum der Sensibilisierung und der konsekutiven Challenges. **II:** Sekundärer Präventionsansatz – Die Diäten (1 % *c9,t11*-CLA w/w der Diät oder Kontrolle) wurden nach der Sensibilisierung ab dem Tag 16 bis zum Tag 32 des Protokolls über den Zeitraum der konsekutiven Challenges gegeben. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b > c$, $p \leq 0,05$ (**I:** 2-faktorielle ANOVA, **II:** 1-faktorielle ANOVA). EU = ELISA units.

Sekundäre Prävention

Durch die erst nach der systemischen Sensibilisierung beginnende Gabe von *c9,t11*-CLA wurde eine deutliche, allerdings nicht signifikante Reduktion der Plasmaiter von Gesamt-IgE (-24 %, $p = 0,123$; Abb. 22 IIA) und OVA-IgE (-40 %, $p = 0,1$; Abb. 22 IIB) erreicht, womit ist ein additiver Effekt der Allergenchallenge auf die IgE-Bildung wahrscheinlich ist. Für die Titer von OVA-IgG1 (Abb. 22 IIC) und OVA-IgG2a (Abb. 22 IID) wurden zwischen den Diätgruppen keine Unterschiede festgestellt. Jedoch war auffällig, dass die Konzentrationen der OVA-IgG2a-Antikörper in beiden Gruppen um ein 10-faches niedriger lagen, als in der immunisierten Kontrollgruppe des Ansatzes Primäre Prävention.

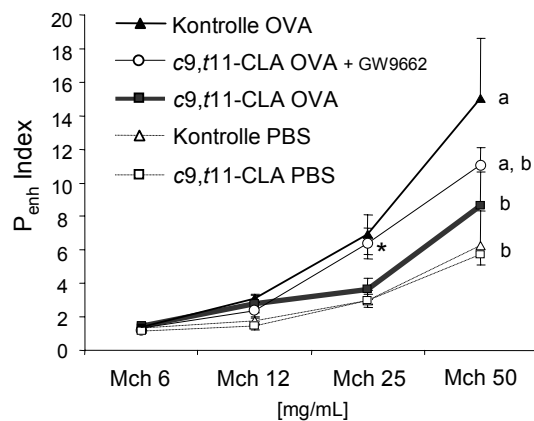
4.6 AR nach cholinenger Provokation

Die relative Zunahme des P_{enh} -Index reflektiert die Atemwegsreaktivität (AR) auf unspezifische Stimuli wie z.B. inhalative Provokation mit Metacholin (Mch) und korreliert mit der Verengung der Atemwege (Hamelmann *et al.* 1997).

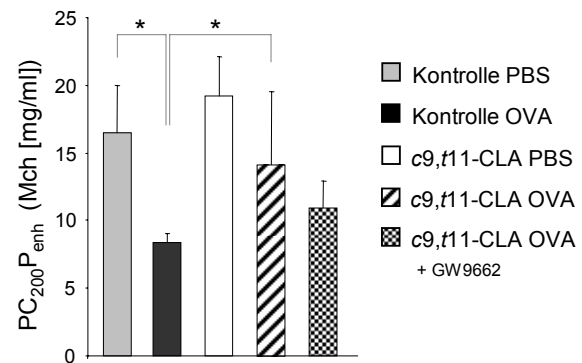
Primäre Prävention

Die inhalative Provokation mit Mch führte nach allergischer Sensibilisierung und Atemwegschallenge zur Ausbildung von AHR, dargestellt durch den konzentrationsabhängigen Anstieg des P_{enh} -Index (Abb. 23 IA). Im Vergleich zu den immunisierten Kontrolltieren zeigten die mit *c9,t11*-CLA gefütterten Tiere der OVA-Gruppe signifikant weniger bronchokonstriktorische Reaktivität auf Mch, was aus dem relativ flacheren Kurvenverlauf des P_{enh} -Index ersichtlich wird ($p = 0,018$; ANOVA für Meßwiederholungen; Abb. 23 IA). Verdeutlicht wird dies ebenfalls durch den signifikant höheren $PC_{200P_{enh}}$ -Wert der immunisierten *c9,t11*-CLA-Gruppe ($p \leq 0,05$ vs. Kontrolle OVA; Abb. 23 IB). Der $PC_{200P_{enh}}$ -Wert beschreibt als Maß zur Bestimmung des Grades der AHR die Mch-Konzentration, die zur Verdopplung des P_{enh} -Basiswertes ($P_{enh/PBS}$) nötig ist. Je niedriger dieser Wert ist, desto stärker ist die Reaktion auf die cholinerge Provokation der Atemwege. Bei den immunisierten und mit *c9,t11*-CLA gefütterten Tieren stieg der P_{enh} -Index nach inhalativer Applikation von GW9662 deutlich an. Dieser Effekt erreichte bei mittlerer Mch-Konzentration statistische Signifikanz ($p = 0,041$ vs. *c9,t11*-CLA OVA bei Mch 25; Student's t-Test; Abb. 23 IA).

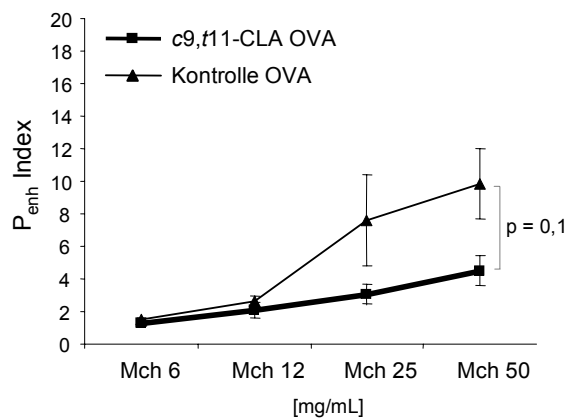
I A



I B



II A



II B

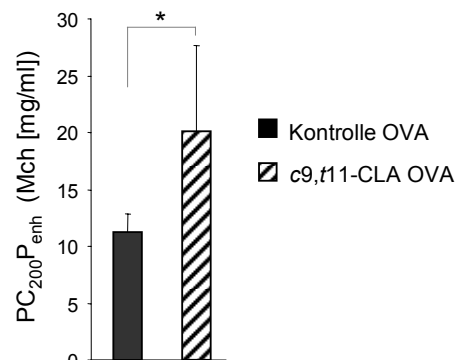


Abb 23: *In vivo*-Messung der AR nach cholinergischer Provokation. **I:** Primärer Präventionsansatz, **II:** Sekundärer Präventionsansatz. **A:** P_{enh} -Index in Abhängigkeit von der Metacholin-Konzentration, signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben $a > b > c$ (ANOVA für Messwiederholungen), * signifikant vs. c9,t11-CLA OVA (Student's t-Test). **B:** $PC_{200P_{enh}}$ beschreibt die Metacholin-Konzentration, bei der sich der P_{enh} -Basiswert verdoppelt. * $p \leq 0,05$

Sekundäre Prävention

Im Vergleich zu den Kontrolltieren des Ansatzes Sekundäre Prävention verlief der konzentrationsabhängige Anstieg des P_{enh} -Index bei den Tieren, die nach der Sensibilisierung und während der Challenge c9,t11-CLA-Diät bekamen, tendenziell flacher ($p = 0,1$; ANOVA für Meßwiederholung; Abb. 23 IIA). Betrachtet man den $PC_{200P_{enh}}$ -Wert, so wird ersichtlich, dass bei der immunisierten Kontrollgruppe signifikant weniger Mch genügte, um einen Anstieg des P_{enh} -Basiswertes auf 200 % zu provozieren ($p = 0,05$; Abb. 23 IIB). Der Vergleich der P_{enh} -Indizes bei Mch 50 und der $PC_{200P_{enh}}$ -Werte beider Präventionsansätze zeigt, dass sowohl die Kontroll- als auch die c9,t11-CLA-Diätgruppe weniger stark auf die cholinerge Provokation reagierte als im Ansatz Primäre Prävention.

4.7 Atemwegsentzündung

4.7.1 Zelluläre Infiltration in die Lunge

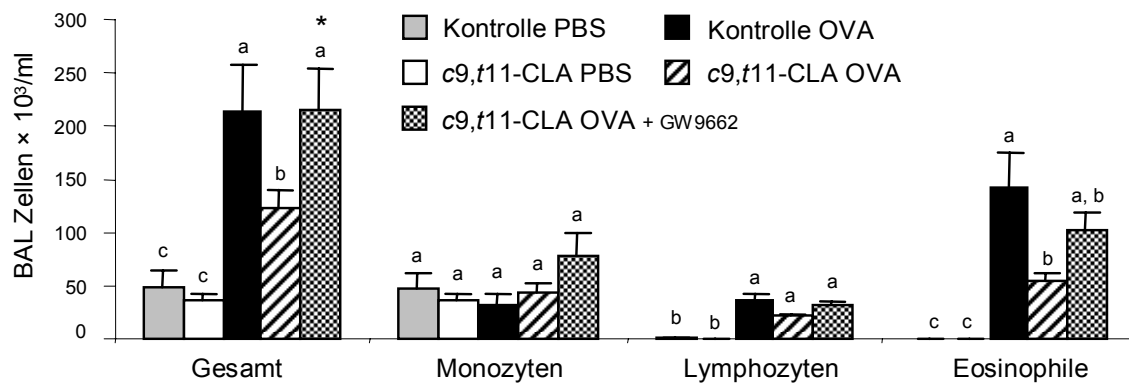
Primäre Prävention

Die systemische Sensibilisierung und inhalative Allergenchallenge bewirkte in den Tieren der Kontrollgruppe eine starke zelluläre Infiltration in die Lunge (Gesamt $214 \pm 44 \times 10^3/\text{ml}$, Haupteffekt der Immunisierung: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle PBS; Abb. 24 I), die von eosinophilen Granulozyten dominiert wurde ($142 \pm 33 \times 10^3/\text{ml}$, $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle PBS). Im Vergleich dazu war in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von immunisierten und mit *c9,t11*-CLA gefütterten Tieren die Anzahl der Gesamtzellen und Eosinophilen signifikant vermindert ($123 \pm 17 \times 10^3/\text{ml}$ bzw. $55 \pm 7 \times 10^3/\text{ml}$, Haupteffekt der Diät: $p = 0,05$ bzw. $p = 0,02$ vs. Kontrolle OVA). Die nach *c9,t11*-CLA-Diät beobachtete Hemmung des zellulären Influx wurde durch Coadministration von GW9662 vollständig aufgehoben ($215 \pm 39 \times 10^3/\text{ml}$, $p = 0,05$ vs. *c9,t11*-CLA OVA). Allerdings war dieser Effekt bezüglich der eosinophilen Population aufgrund der leicht erhöhten Monozytenzahl nicht signifikant ($p = 0,138$ vs. *c9,t11*-CLA OVA; Abb. 24 I). Die BAL von PBS-Kontrolltieren beider Diätgruppen enthielt wenig Zellen ($36-48 \pm 15 \times 10^3/\text{ml}$), die zu $> 98 \%$ als Monozyten identifiziert wurden.

Sekundäre Prävention

Die differenzielle Zellzahlbestimmung in der BAL der immunisierten Kontrollgruppe zeigte eine ähnliche Stärke (Gesamt $248 \pm 43 \times 10^3/\text{ml}$; Abb. 24 II) und ein ähnliches Verteilungsmuster der infiltrierten Zellen wie im Ansatz Primäre Prävention. Gleichfalls waren die Eosinophilen mit etwa 71 % die dominierende Population in der BAL der immunisierten Kontrollgruppe ($178 \pm 40 \times 10^3/\text{ml}$; Abb. 24 II). Die erst nach der systemischen Sensibilisierung beginnende Gabe von *c9,t11*-CLA konnte den provozierten zellulären Influx in die Lungen nicht hemmen (Gesamt $204 \pm 36 \times 10^3/\text{ml}$; Abb. 24 II). Allerdings zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der Anzahl eosinophiler Granulozyten ($117 \pm 26 \times 10^3/\text{ml}$; $p = 0,08$; Abb. 24 II).

I



II

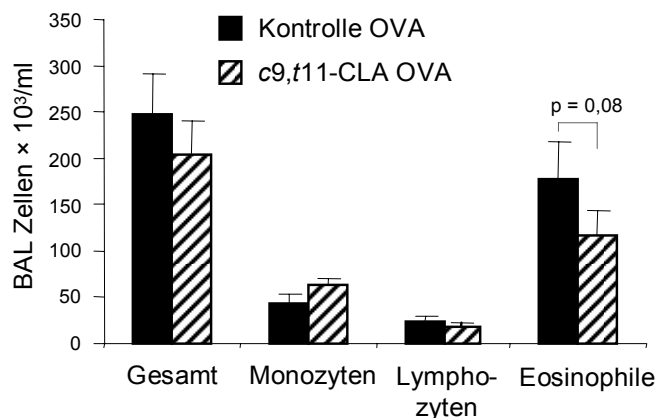


Abb. 24: Differenzielle Zellzahlbestimmung in der BAL. Die Zellen wurden 48 h nach der letzten Atemwegs-challenge differenziert. **I:** Primärer Präventionsansatz. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b > c$, $p \leq 0,05$ (2-faktorielle ANOVA), *Signifikant verschieden von c9,t11-CLA OVA, $p \leq 0,05$ (Student's t-Test). **II:** Sekundärer Präventionsansatz.

4.7.2 IL-5 in der BAL

Primäre Prävention

Nach allergischer Sensibilisierung und Atemwegschallenge stieg die IL-5-Konzentration in der BAL signifikant an (Haupteffekt der Immunisierung: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle PBS; Abb. 25 I). Durch die Fütterung von c9,t11-CLA vor und während der Immunisierung wurde die IL-5-Produktion um 50 ± 10 % gehemmt (Haupteffekt der Diät: $p = 0,035$ vs. Kontrolle OVA; Abb. 25 I). In der BAL der Tiere, die c9,t11-CLA-Diät und zusätzlich vor und während jeder Challenge den PPAR γ -Inhibitor GW9662 inhalativ appliziert bekamen, stieg der IL-5-Proteingehalt in der BAL wieder signifikant an ($p = 0,05$ vs. c9,t11-CLA OVA).

Sekundäre Prävention

Auch in sensibilisierten Tieren konnte die provozierte IL-5-Produktion in der Lunge durch *c9,t11*-CLA Diät nach nur 16 Tagen Fütterungsdauer um $50 \pm 7 \%$ reduziert werden ($p \leq 0,01$; Abb. 25 II).

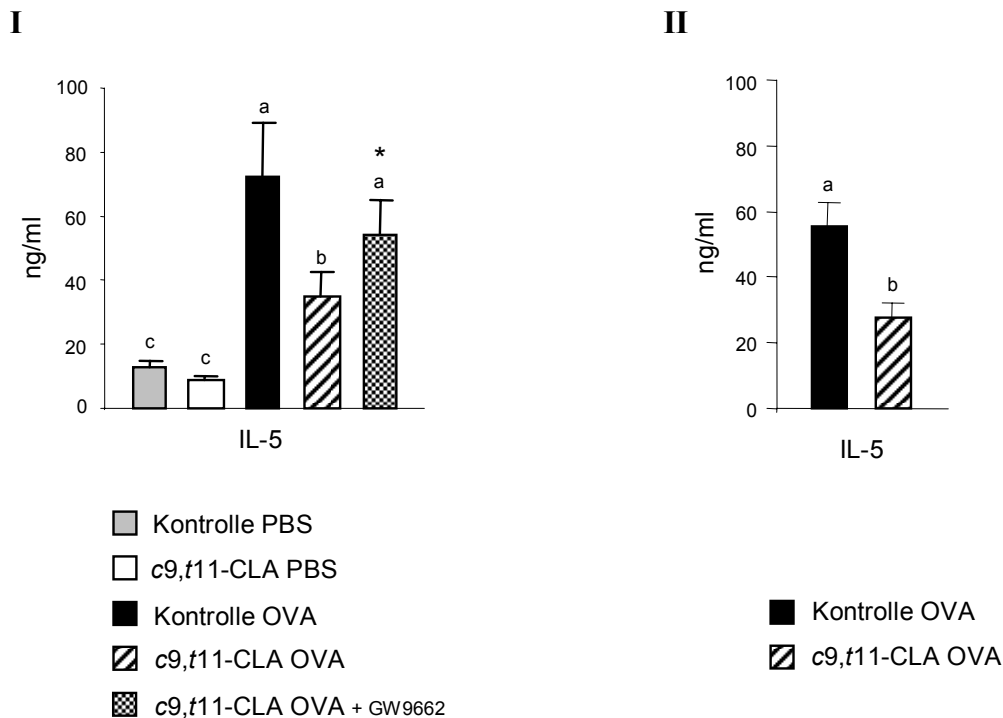


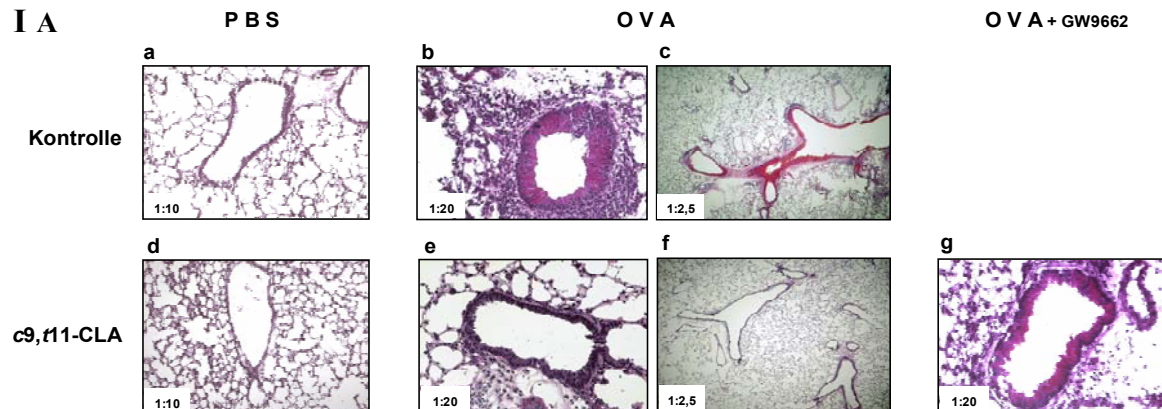
Abb. 25: IL-5 in der BAL. Die Konzentration an IL-5 wurde 48 h nach der letzten Atemwegschallenge mittels ELISA bestimmt. **I:** Primärer Präventionsansatz. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b > c$, $p \leq 0,05$ (2-faktorielle ANOVA), *Signifikant verschieden von *c9,t11*-CLA OVA, $p \leq 0,05$ (Student's t-Test). **II:** Sekundärer Präventionsansatz. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b$, $p \leq 0,05$ (Student's t-Test).

4.7.3 Histologische Veränderungen in der Lunge

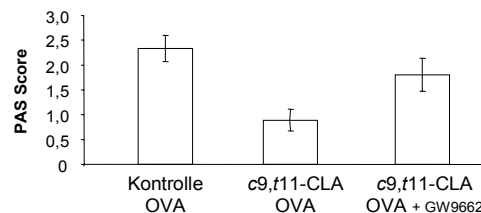
Primäre Prävention

In den Lungen der immunisierten Kontrolltiere waren nach Allergenchallenge und unspezifischer Provokation am auffälligsten die typischen pathologischen Veränderungen zu erkennen: Becherzellhyperplasie, Mukusakkumulation und peribronchiale Infiltrate (Abb. 26 IA b und c). Nach mikroskopischer Beurteilung ließen sich für diese Gruppe semiquantitativ $2,3 \pm 0,3$ PAS-Score-Punkte ermitteln (Abb. 26 IB). Immunisierte und mit *c9,t11*-CLA gefütterte Tiere zeigten mit einem Score von $0,9 \pm 0,2$ dagegen wenig bis keine der pathologischen Veränderungen (Abb. 26 IA e und f, Abb. 26 IB). Coadministration von GW9662 während der OVA-Challenges führte zur verstärkten Schleimbildung in den

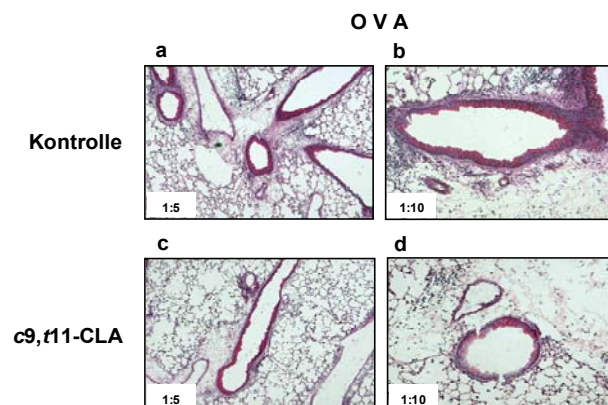
Bronchien und Bronchiolen der *c9,t11*-CLA-Gruppe, was einem PAS-Score von $1,8 \pm 0,3$ entsprach (Abb. 26 IA g, Abb. 26 IB). Die Lungengewebe der PBS-Tiere beider Diätgruppen waren histologisch unauffällig (Abb. 26 IA a und d).



I B



II A



II B

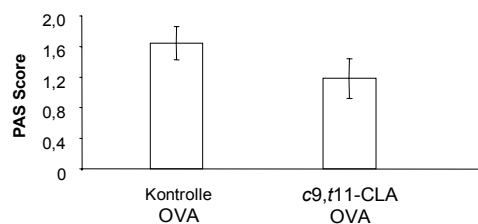


Abb. 26: Histopathologische Veränderungen in der Lunge. Dargestellt sind repräsentative Bronchien und Bronchiolen nach PAS-Färbung von Gewebeschnitten der Lunge. (A). Der semiquantitative PAS-Score bezeichnet das Ausmaß der pathologischen Veränderungen (B). **I:** Primärer Präventionsansatz. **II:** Sekundärer Präventionsansatz.

Sekundäre Prävention

Mit $1,2 \pm 0,3$ vs. $1,6 \pm 0,2$ semiquantitativen PAS-Score-Punkten (Abb. 26 IIB) waren die allergenassoziierten histopathologischen Veränderungen in den Lungen der *c9,t11*-CLA-Gruppe ausgeprägter als im Ansatz Primäre Prävention und der Unterschied zur Kontrollgruppe weniger deutlich (Abb. 26 IIA).

4.8 PPAR γ -mRNA-Expression in der Lunge

Primäre Prävention

Die PPAR γ -mRNA-Expression in den Lungen schein-(PBS-)sensibilisierter Tiere wurde durch die unterschiedlichen Diäten nicht beeinflusst (Abb. 27 I). Allergische Sensibilisierung und Challenge bewirkte ein Abfallen der in den Lungen der Kontrolltiere exprimierten PPAR γ -mRNA um 65 % (PPAR γ / β -Actin = $0,59 \pm 0,1$; $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle PBS; Abb. 27 I). Dagegen war die PPAR γ -mRNA-Expression in der immunisierten und mit *c9,t11*-CLA gefütterten Gruppe auf dem Level von schein-(PBS-)sensibilisierten Tieren und signifikant verschieden von der immunisierten Kontrolldiätgruppe (PPAR γ / β -Actin = $1,5 \pm 0,2$; $p \leq 0,001$; Abb. 27 I). Nach inhalativer Applikation des PPAR γ -Inhibitors war kaum noch mRNA des Rezeptors in den Lungen der immunisierten *c9,t11*-CLA-Gruppe detektierbar (PPAR γ / β -Actin = $0,1 \pm 0,1$; $p \leq 0,001$ vs. *c9,t11*-CLA OVA; Abb. 27 I).

Sekundäre Prävention

Die erst nach der systemischen Sensibilisierung beginnende Fütterung von *c9,t11*-CLA konnte die Downregulation der PPAR γ -mRNA-Expression nicht verhindern (PPAR γ / β -Actin = $0,83 \pm 0,3$; Abb. 27 II). Im Vergleich zur 39-tägigen Fütterung der *c9,t11*-CLA-Diät im Ansatz Primäre Prävention (PPAR γ / β -Actin = $1,5 \pm 0,2$; Abb. 27 I) wurde nach 16-tägiger Fütterung ca. 45 % weniger alveoläre mRNA des Rezeptors detektiert. In den Lungen der immunisierten Kontrollgruppe lag die Expression der PPAR γ -mRNA auf einem vergleichbaren Level wie im Ansatz Primäre Prävention (PPAR γ / β -Actin = $0,64 \pm 0,1$; Abb. 27 II).

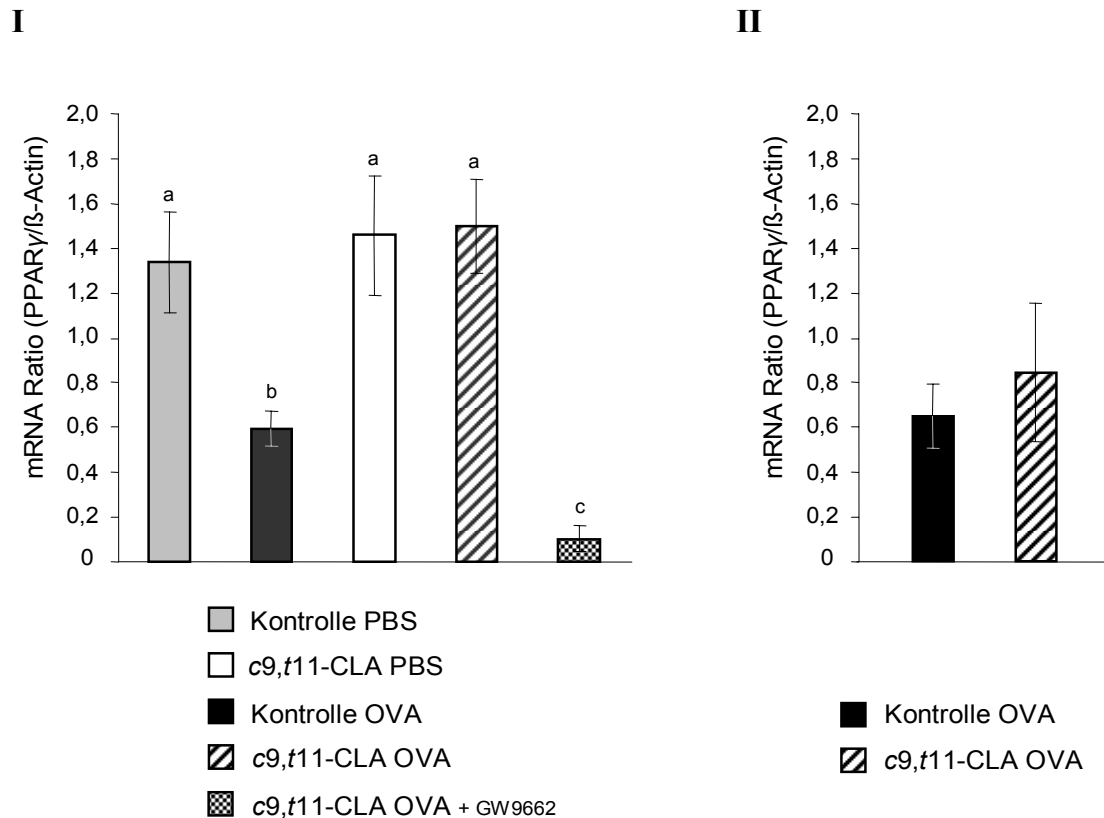


Abb. 27: PPAR γ -mRNA-Expression in der Lunge. PPAR γ -mRNA wurde in einer RT-PCR quantifiziert und über β -Actin normalisiert. **I:** Primärer Präventionsansatz. **II:** Sekundärer Präventionsansatz. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $a > b > c$; $p < 0,05$.

4.9 Proliferation der Splenozyten

Primäre Prävention

Die proliferative Reaktivität von Milz-MNC auf Allergenstimulation wurde anhand des Einbaus von markiertem Thymidin in die DNA gemessen. Nach 39-tägiger Fütterung der c9,t11-CLA-angereicherten Diät vor und während der Sensibilisierung und Challenge proliferierten die Splenozyten deutlich geringer als in der immunisierten Kontrollgruppe ($p = 0,07$; Abb. 28 A). Gleichzeitig akkumulierte c9,t11-CLA zu $2,0 \pm 0,1$ % der FSME in der Milz (Abb. 28 B) während die Konzentration von C20:4n6 und der Gesamt-n6-PUFA um 48 ± 6 % bzw. 50 ± 5 % sank ($p \leq 0,01$; Abb. 28 C und $p \leq 0,001$; Abb. 28 D).

Da die Reduktion der Splenozyten-Proliferation keine statistische Signifikanz erreichte, wurde im Ansatz Sekundäre Prävention auf diesen Analysenteil verzichtet.

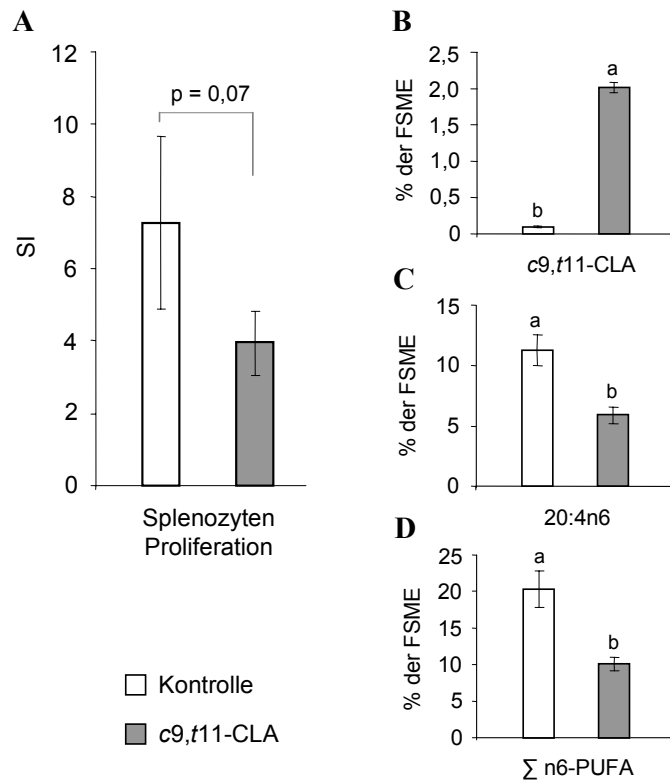


Abb. 28: **A:** Proliferation der Splenozyten nach Allergenstimulation in Abhängigkeit von der Gewebekonzentration von **B:** *c9,t11*-CLA, **C:** C20:4n6 (AA) und **D:** der Gesamt-n6-PUFA (in % der FSME) nach 39-tägiger Fütterung einer *c9,t11*-CLA-angereicherten oder Kontrolldiät. Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, a > b; p < 0,05. FSME · Fettsäuremethylester, SI · Stimulationsindex.

4.10 Eicosanoidpräkursorische Fettsäuren

Primäre Prävention

Nach 39-tägiger Fütterung der CLA-Diät stieg die Konzentration von *c9,t11*-CLA im abdominalen Fettgewebe von < 0,2 % auf $6,3 \pm 1,1$ % der FSME ($p \leq 0,001$ vs. Kontrolle). Gleichzeitig sank der prozentuale Anteil der n6-PUFA an den Gesamt-FSME um 48 ± 2 % ($p \leq 0,001$; Abb. 29 IA). In der Leber und in den Erythrozyten erhöhte sich die *c9,t11*-CLA von < 0,1 % auf $2,0 \pm 0,1$ % bzw. $1,7 \pm 0,1$ % der FSME ($p \leq 0,001$; Abb. 29 IB und C). Die 37 %ige Reduktion der n6-PUFA-Fraktion in der Leber nach 39-tägiger CLA-Diät ($p \leq 0,001$; Abb. 29 IB) resultierte hauptsächlich aus einem Abfall der C20:4n6 von $12,5 \pm 0,9$ % auf $7,9 \pm 0,7$ % der FSME ($p \leq 0,01$; Abb. 29 IB). In den Erythrozyten wurde die CLA-abhängige Reduktion der C20:4n6 (-13 ± 4 %; $p \leq 0,01$) bzw. der Gesamt-n6-PUFA (-26 ± 3 %; $p \leq 0,01$) begleitet von einem Anstieg der n3-PUFA um 15 ± 4 % gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,05$; Abb. 29 IC).

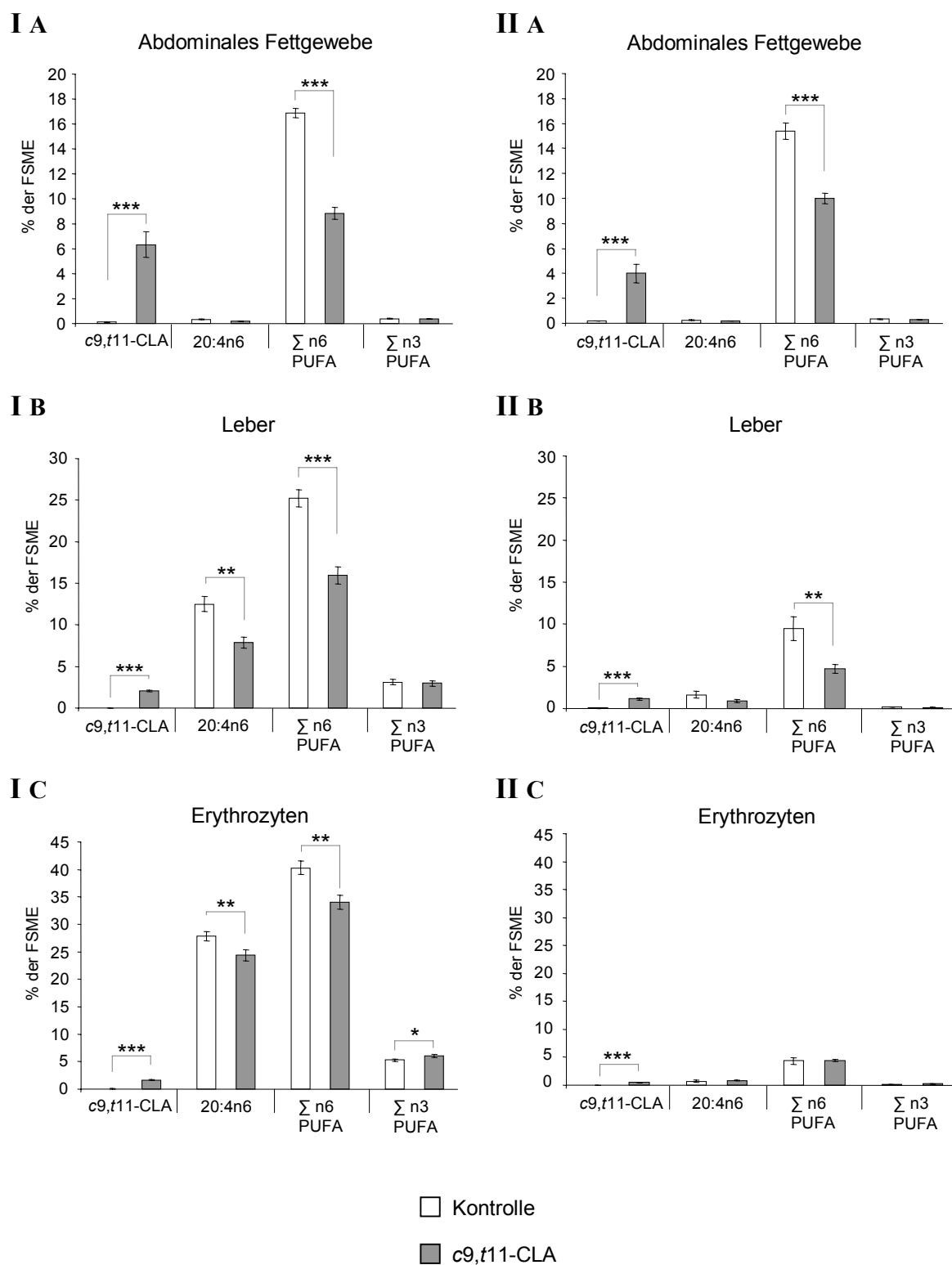


Abb. 29: Gewebekonzentrationen von *c9,t11*-CLA, C20:4n6 (AA) und der Gesamt-n6- und -n-3-PUFA. **I:** Primärer Präventionsansatz. **II:** Sekundärer Präventionsansatz. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Sekundäre Prävention

Nach 16-tägiger Fütterung der CLA-Diät stieg der Anteil von *c9,t11*-CLA an den im abdominalen Fettgewebe akkumulierten Fettsäuren von $< 0,2 \%$ auf $4,0 \pm 0,7 \%$ ($p \leq 0,001$ vs. Kontrolle), während sich die n6-PUFA-Fraktion um $35 \pm 3 \%$ verminderte ($p \leq 0,001$; Abb. 29 IIA). In der Leber wurde ein Anstieg der *c9,t11*-CLA-Konzentration auf $1,2 \pm 0,1 \%$ der FSME erreicht ($p \leq 0,001$). Gleichzeitig sank der Anteil der n6-PUFA, allerdings ohne signifikante Veränderung der C20:4n6, von $9,5 \pm 1,4 \%$ auf $4,7 \pm 0,5 \%$ der FSME ($p \leq 0,01$; Abb. 29 IIB). In den Erythrozyten hatte der Anstieg von *c9,t11*-CLA von $< 0,1 \%$ auf $0,5 \%$ der FSME keine Auswirkung auf die prozentualen Gehalte an n6- und n3-PUFA (Abb. 29 IIC). Allerdings zeigte der Vergleich der Kontrolltiere mit denen des Ansatzes Primäre Prävention, dass der Anteil der n6- und n3-PUFA im Lebergewebe um 66 % bzw. 90 % und in den Erythrozyten um 89 % bzw. 96 % reduziert war.

Teil II - Metabolismus

4.11 Phänotypen

4.11.1 Körpergewicht und Futterverbrauch

Zwischen den drei Diätgruppen wurden während der 39-tägigen Fütterungsdauer weder bei der Entwicklung des Körpergewichtes (Abb. 30 A) noch im täglichen Futterverbrauch (Abb. 30 B) Unterschiede festgestellt.

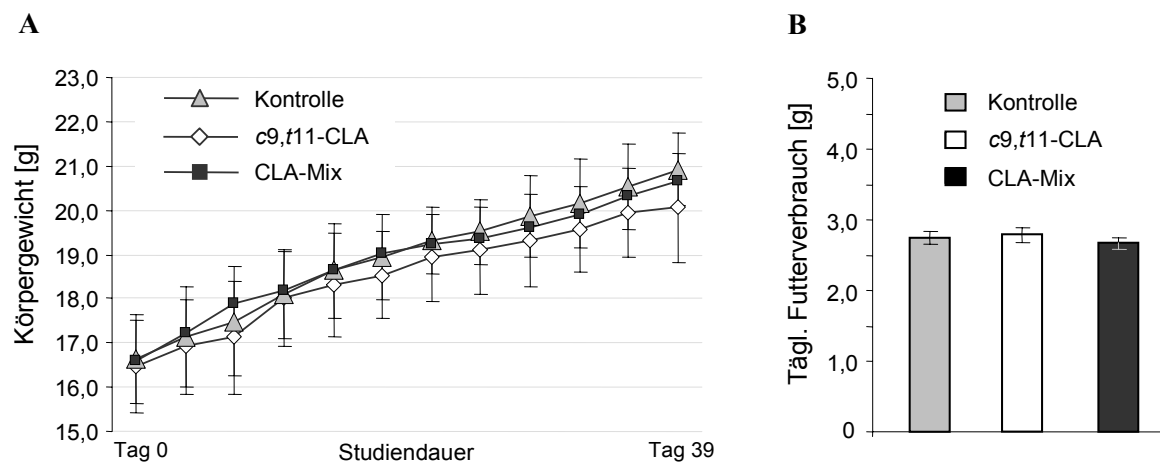


Abb. 30: A: Entwicklung des Körpergewichtes und B: Mittlerer täglicher Futterverbrauch während der 39-tägigen Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten.

4.11.2 Körperfettverteilung

Nach 39-tägiger Fütterungsdauer zeigten die Tiere der CLA-Mix-Gruppe die für Lipodystrophie charakteristischen phänotypischen Veränderungen in der Körperfettverteilung. Die drastische Reduktion des abdominalen Fettgewebes war verbunden mit einer steatösen Hepatomegalie (Abb. 31 C). Die Lebern dieser Tiere wogen mit 1728 ± 157 g das 1,8-fache bzw. Doppelte der c9,t11-CLA- bzw. Kontrollgruppe und wiesen einen 5- bis 6-fach höheren Fettgehalt auf ($p \leq 0,001$; Abb. 31 A). Gleichzeitig war das abdominale Fettgewebe um 54 ± 6 % (vs. c9,t11-CLA) bzw. 59 ± 4 % (vs. Kontrolle) reduziert ($p \leq 0,001$; Abb. 31 B). Verglichen mit der Kontrolle gab es keine Unterschiede im Organgewicht und Fettgehalt der Lebern und des abdominalen Fettgewebes der c9,t11-CLA-Gruppe.

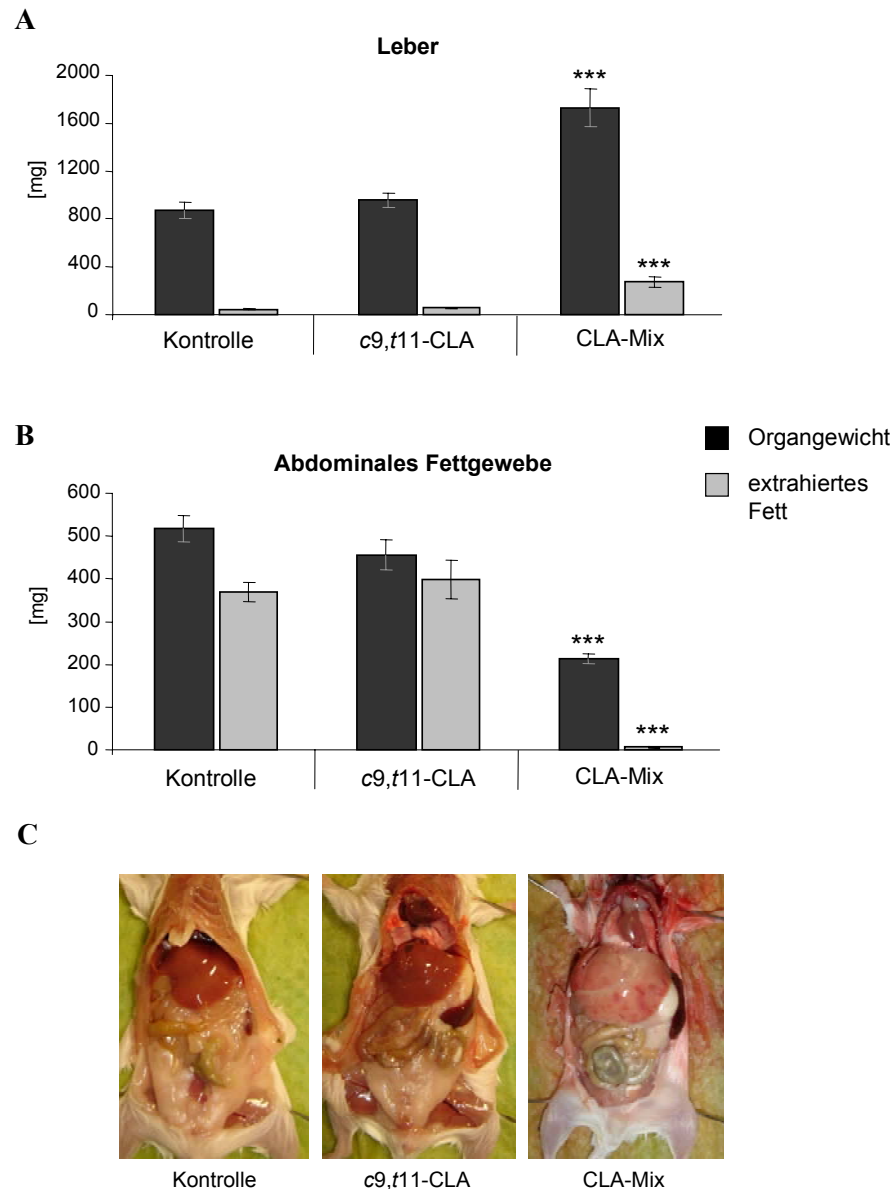


Abb. 31: Phänotypische Veränderungen in der Körperfettverteilung nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten. **A:** Masse des Abdominalfettgewebes und Fettgehalt. **B:** Lebergewicht und Organfettgehalt. **C:** Repräsentative Aufnahmen der eröffneten Abdomen; *** $p \leq 0,001$

4.12 Fettsäureanalytik

4.12.1 Abdominales Fettgewebe

Zwischen der Kontrollgruppe und der mit der *c9,t11*-CLA-reichen Diät gefütterten Gruppe wurden keine Unterschiede im Verhältnis der SFA- ($26,0 \pm 0,8 \%$ vs. $26,5 \pm 1,6 \%$ der FSME), MUFA- ($54,3 \pm 0,8 \%$ vs. $53,3 \pm 1,6 \%$) und PUFA[§]-Fraktionen ($17,6 \pm 0,4 \%$ vs. $17,9 \pm 1,9 \%$) in den Lipiden des abdominalen Fettgewebes festgestellt (Abb. 32).

[§] einschließlich CLA

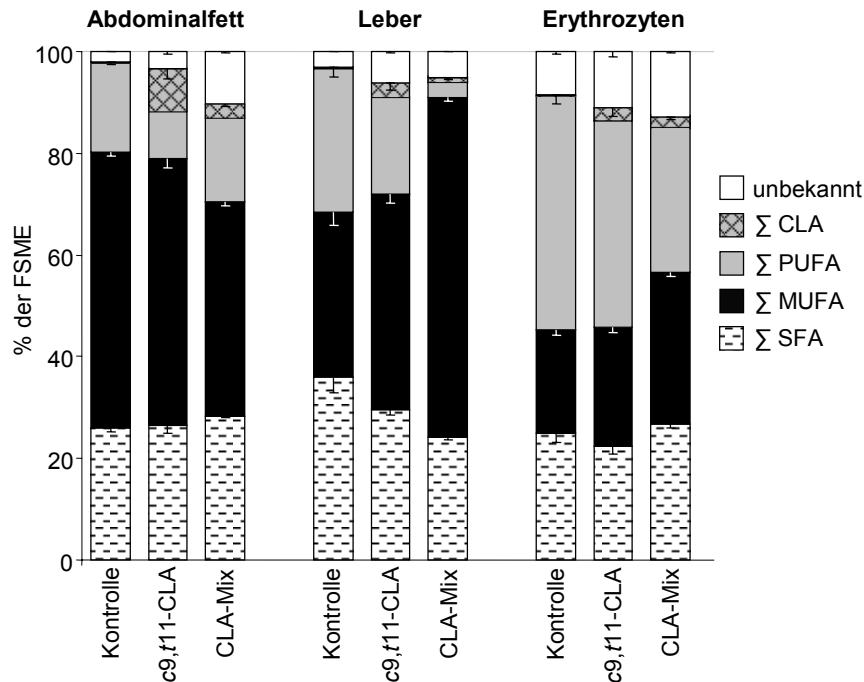


Abb. 32: Verhältnisse der Fettsäurenfraktionen im abdominalen Fettgewebe, der Leber und den Erythrozyten nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten. CLA · conjugated linoleic acids, PUFA · polyunsaturated fatty acids, MUFA · monounsaturated fatty acids, SFA · saturated fatty acids

Erwartungsgemäß wurde die PUFA-Fraktion in der Kontrollgruppe entsprechend der Diät von LA ($16,3 \pm 0,4$ % der FSME) dominiert, während sich nach *c9,t11*-CLA-reicher Diät der Anteil der C18:2n6 (LA) zugunsten der CLA um die Hälfte verminderte ($p < 0,05$; Tab. 12). Der CLA-Gesamtgehalt im abdominalen Fettgewebe stieg in dieser Gruppe auf $8,6 \pm 1,4$ % der FSME an, wobei 98 % als 9,11-Isomeren identifiziert wurden. Unter den *c,t*-Isomeren entfielen 1 % auf *c11,t13*-CLA und 99 % auf *c9,t11*-CLA, das mit 74 % das Hauptisomere der Gesamt-CLA darstellte. Mit 17 % bzw. 7 % der Gesamt-CLA waren *c9,c11*-CLA bzw. *t9,t11*-CLA die zweit- bzw. dritthäufigsten Isomeren. 1 % der Gesamt-CLA wurde den Minorisomeren zugeordnet und ist als Rest CLA ausgewiesen (Tab. 12). Im Vergleich zur Kontrolle und zur *c9,t11*-CLA-Diät blieb der prozentuale Anteil der PUFA-Fraktion nach CLA-Mix-Zulage unverändert, während die MUFA zugunsten der SFA und eines nicht identifizierbaren Restes um 23 % (vs. Kontrolle) bzw. 20 % (vs. *c9,t11*-CLA-Gruppe) sanken (Abb. 32). Betrachtet man das Verhältnis der SFA und ihrer analogen Monoene unter Berücksichtigung des Restes und berechnet den SCD-Index, so zeigt sich, dass dieser um 11-12 % nach CLA-Mix-Diät abfiel ($p < 0,05$). Mithilfe des SCD-Index lassen sich Aussagen zur Aktivität der Stearoyl-CoA-Desaturase (Δ^9 -Desaturase), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym in der Biosynthese der MUFA, treffen (Corl *et al.* 2001). Er wird

folgendermaßen berechnet:

$$\text{SCD-Index} = \frac{\text{MUFA}}{(\text{SFA} + \text{MUFA})}$$

Obwohl sich die *c9,t11*-CLA-Diät und die CLA-Mix-Diät in ihrem LA-Gehalt nicht unterschieden (siehe Tab. 6), wurde signifikant weniger dieser Fettsäure in den Lipiden des Abdominalfettes der CLA-Mix-Gruppe detektiert ($p < 0,05$; Tab. 12).

Tabelle 12: Fettsäurenspektrum des abdominalen Fettgewebes nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten [% der FSME]

Fettsäure \ Diät	Kontrolle	<i>c9,t11</i> -CLA	CLA-Mix
SFA			
C14:0	1,4 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^b
C16:0	21,7 ± 0,7 ^a	22,5 ± 1,4 ^a	18,5 ± 0,1 ^b
C18:0	2,1 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,1 ^b	9,2 ± 0,2 ^a
<i>Rest SFA</i>	< 1,0	< 1,0	< 0,5
MUFA			
C16:1	9,2 ± 0,2 ^a	10,5 ± 0,6 ^a	2,1 ± 0,2 ^b
C18:1 <i>c9</i>	38,7 ± 0,4 ^a	35,1 ± 0,7 ^b	31,0 ± 0,5 ^c
C18:1 <i>c11</i>	4,9 ± 0,1 ^b	5,2 ± 0,2 ^b	7,7 ± 0,2 ^a
C20:1 <i>c11</i>	1,1 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a
<i>Rest MUFA</i>	< 0,5	< 0,5	< 0,5
PUFA			
C18:2 <i>n6</i>	16,3 ± 0,3 ^a	8,2 ± 0,4 ^b	5,4 ± 0,1 ^c
γC18:3 <i>n6</i>	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C20:4 <i>n6</i>	< 0,5 ^b	< 0,5 ^b	8,5 ± 0,3^a
C22:5 <i>n6</i>	< 0,5 ^b	< 0,5 ^b	1,1 ± 0,1 ^a
αC18:3 <i>n3</i>	< 0,5	< 0,5	< 0,1
C20:5 <i>n3</i>	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C22:5 <i>n3</i>	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C22:6 <i>n3</i>	< 0,1 ^b	< 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^a
<i>Rest PUFA (ohne CLA)</i>	< 1,0	< 0,5	< 1,0
CLA			
<i>c9,t11</i> -CLA	< 0,1 ^c	6,3 ± 1,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^b
<i>t10,c12</i> -CLA	< 0,01 ^b	< 0,01 ^b	1,2 ± 0 ^a
<i>c9,c11</i> -CLA	< 0,1 ^b	1,5 ± 0,2 ^a	< 0,1 ^b
<i>t9,t11</i> -CLA	< 0,1 ^b	0,6 ± 0,2 ^a	< 0,1 ^b
<i>Rest CLA</i>	< 0,1	< 0,2	< 0,1
Unbekannt	2,1 ± 0,1	3,3 ± 0,6	10,4 ± 0,2
SCD-Index	0,68 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,02 ^a	0,59 ± 0,01 ^b

Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $p < 0,05$ ($a > b > c$).

Dagegen stiegen die prozentualen Anteile der langkettigen hochungesättigten n6-PUFA C20:4n6 (AA) und C22:5n6 signifikant an ($p \leq 0,001$; Tab. 12), wobei der Anteil von AA an den n6-PUFA 55 % betrug (vs. 2 % in der Kontroll- bzw. *c9,t11*-CLA-Gruppe; $p \leq 0,001$). Im Vergleich zur *c9,t11*-CLA-Diät stieg der CLA-Gesamtgehalt im Abdominalfett nach 39-tägiger Gabe der CLA-Mix-Diät nur auf $2,6 \pm 0,1$ % der FSME. Somit akkumulierten, bezogen auf 100 % der detektierten FSME, 70 % weniger CLA in den Lipiden des abdominalen Fettgewebes als nach *t10,c12*-CLA-freier Diät ($p \leq 0,001$). *C9,t11*-CLA und *t10,c12*-CLA dominierten die CLA mit 48 % bzw. 46 %. Die restlichen CLA setzten sich zu 3 % aus *c9,c11*-CLA, zu 2 % aus *t9,t11*-CLA und zu 0,2 % aus *c11,t13*-CLA zusammen. 1 % der Gesamt-CLA ist als Minorisomeren unter Rest CLA subsumiert.

4.12.2 Leber

Die Fraktionen der SFA, MUFA und PUFA (einschließlich CLA) betrugen in den Lebern der Kontrollgruppe $36,9 \pm 3,1$ %, $32,3 \pm 2,5$ % und $28,6 \pm 2,2$ % der FSME (Abb. 32). Der CLA-Anteil lag bei $< 0,1$ % (Tab. 13). Nach 39-tägiger Fütterung der *c9,t11*-CLA-angereicherten Diät verschob sich das Verhältnis aufgrund einer signifikanten Reduktion der PUFA-Fraktion, hauptsächlich der n6-PUFA ($p < 0,05$ für LA, AA und C22:5n6; Tab. 13), zugunsten der MUFA ($42,2 \pm 1,7$ % der FSME; Abb. 32, Tab. 13). Die Summe der CLA stieg auf $2,9 \pm 0,2$ % der FSME, das Hauptisomere war mit 70 % der Gesamt-CLA auch hier *c9,t11*-CLA. 26 % der Gesamt-CLA entfielen auf *c9,c11*-CLA und 3 % auf *t9,t11*-CLA. Somit stellten die 9,11-Isomeren > 99 % der Gesamt-CLA dar. Nach CLA-Mix-Fütterung über 39 Tage stieg der CLA-Anteil im Lebergewebe auf $0,8 \pm 0,1$ % der FSME, wobei sich mit 62 % der Gesamt-CLA hauptsächlich das *c9,t11*-CLA-Isomere anreicherte. Hingegen wurden lediglich 16 % der CLA als *t10,c12*-CLA identifiziert. Die CLA-Mix-Zulage resultierte in einer deutlichen Verschiebung der Verhältnisse der Fettsäurenfraktionen zugunsten der MUFA, deren Anteil von $66,9 \pm 0,9$ % der FSME die MUFA-Anteile im Lebergewebe der Kontroll- und *c9,t11*-CLA-Gruppe weit überstieg (Abb. 32). Diese Verschiebung wurde maßgeblich bedingt durch eine unphysiologische Akkumulation der C18-Monoene. Die C18:1c9 war mit fast 50 % der FSME die dominierende Fettsäure im Lebergewebe und im Vergleich zur Kontrolle in ihrem relativen Anteil um das 2,2-fache erhöht ($p \leq 0,001$; Tab. 13). Gleichzeitig nahmen die prozentualen Gehalte der SFA (-32 % vs. Kontrolle und -18 % vs. *c9,t11*-CLA-Diät; $p < 0,05$) und der PUFA (-87 % vs. Kontrolle und -83 % vs. *c9,t11*-CLA-Diät; $p \leq 0,001$) signifikant ab. Im

Gegensatz zum Abdominalfett stieg der hepatische SCD-Index infolge der CLA-Mix-Diät signifikant an (Tab. 13).

Tabelle 13: Fettsäurenspektrum der Lebern nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten [% der FSME]

Fettsäure \ Diät	Kontrolle	c9,t11-CLA	CLA-Mix
SFA			
C16:0	22,2 ± 1,6 ^a	19,9 ± 0,6 ^a	20,4 ± 0,5 ^a
C18:0	12,9 ± 1,4 ^a	9,0 ± 0,5 ^b	3,2 ± 0,1 ^c
Rest SFA	< 1,5	< 1,5	< 1,0
MUFA			
C16:1	2,7 ± 0,3 ^c	4,4 ± 0,3 ^a	3,6 ± 0,1 ^b
C18:1c9	22,1 ± 1,3 ^c	28,0 ± 1,1 ^b	49,1 ± 0,4^a
C18:1c11	5,7 ± 0,3 ^c	8,5 ± 0,3 ^b	11,0 ± 0,2 ^a
C20:1c11	0,7 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,1 ^b	2,7 ± 0,1 ^a
Rest MUFA	< 1,0	< 1,0	< 1,0
PUFA			
C18:2n6)	8,6 ± 0,6 ^a	5,0 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,1 ^c
γC18:3n6	< 0,5	< 0,5	< 0,1
C20:4n6	12,5 ± 0,9 ^a	7,9 ± 0,7 ^b	0,9 ± 0,1 ^c
C22:5n6	3,0 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,2 ^b	0,3 ± 0,1 ^c
αC18:3n3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C20:5n3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C22:5n3	< 0,1	< 0,1	< 0,01
C22:6n3	3,0 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	0,5 ± 0,1 ^b
Rest PUFA (ohne CLA)	< 1,5	< 1,5	< 0,5
CLA			
c9,t11-CLA	< 0,1 ^c	2,0 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^b
t10,c12-CLA	< 0,01 ^b	< 0,0 ^b	0,1 ± 0,01 ^a
c9,c11-CLA	< 0,1 ^b	0,8 ± 0,1 ^a	< 0,1 ^b
t9,t11-CLA	< 0,1 ^b	0,1 ± 0,02 ^a	< 0,1 ^b
Rest CLA	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Unbekannt	3,2 ± 0,1	6,1 ± 0,2	5,1 ± 0,1
SCD-Index	0,47 ± 0,03 ^c	0,58 ± 0,01 ^b	0,73 ± 0,01 ^a

Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $p < 0,05$ ($a > b > c$).

4.12.3 Erythrozyten

In den Erythrozyten der Kontrollgruppe waren nach 39-tägiger Diät die Fettsäurenfractionen wie folgt verteilt: 24,7 ± 1,7 % SFA, 20,4 ± 1,2 % MUFA und 46,0 ± 1,6 %

PUFA ** (Abb. 32). Den größten Anteil bildeten mit $40,3 \pm 1,1$ % der FSME die n6-PUFA, wobei AA mit $27,8 \pm 0,9$ % der FSME nicht nur die Hauptfettsäure der n6-PUFA-Fraktion, sondern auch der Gesamt-FSME war (Tab. 14).

Tabelle 14: Fettsäurenspektrum der Erythrozyten nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten [% der FSME]

Fettsäure \ Diät	Kontrolle	c9,t11-CLA	CLA-Mix
SFA			
C16:0	$14,4 \pm 0,6^b$	$14,7 \pm 0,8^b$	$18,1 \pm 0,3^a$
C18:0	$8,9 \pm 1,0^a$	$6,4 \pm 0,3^b$	$7,8 \pm 0,3^{a,b}$
Rest SFA	$< 1,5$	$< 1,5$	$< 1,0$
MUFA			
C16:1	$0,7 \pm 0,02^b$	$1,1 \pm 0,03^a$	$0,7 \pm 0,1^b$
C18:1c9	$14,1 \pm 0,2^b$	$15,5 \pm 0,2^b$	$20,9 \pm 0,4^a$
C18:1c11	$2,9 \pm 0,1^c$	$4,0 \pm 0,1^b$	$5,3 \pm 0,1^a$
C20:1c11	$1,3 \pm 0,8^a$	$1,6 \pm 0,5^a$	$1,9 \pm 0,1^a$
Rest MUFA	$< 1,5$	$< 1,5$	$< 1,0$
PUFA			
C18:2n6	$6,3 \pm 0,2^a$	$4,6 \pm 0,1^b$	$2,6 \pm 0,1^c$
γC18:3n6	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,1$
C20:4n6	$27,8 \pm 0,9^a$	$24,3 \pm 1,0^b$	$18,2 \pm 0,2^c$
C22:5n6	$4,9 \pm 0,1^a$	$3,4 \pm 0,1^b$	$2,5 \pm 0,1^c$
αC18:3n3	$< 0,5$	$< 0,5$	$< 0,5$
C20:5n3	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,1$
C22:5n3	$< 0,5$	$< 0,5$	$< 0,5$
C22:6n3	$4,6 \pm 0,2^b$	$5,4 \pm 0,2^a$	$3,8 \pm 0,2^c$
Rest PUFA (ohne CLA)	$< 1,5$	$< 1,5$	$< 0,5$
CLA			
c9,t11-CLA	$< 0,1^c$	$1,7 \pm 0,1^a$	$0,9 \pm 0,01^b$
t10,c12-CLA	$< 0,1^b$	$< 0,1^b$	$0,8 \pm 0,02^a$
c9,c11-CLA	$< 0,1^b$	$0,4 \pm 0,02^a$	$< 0,1^b$
t9,t11-CLA	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,01$
Rest CLA	$< 0,1$	$< 0,5$	$< 0,5$
Unbekannt	$8,4 \pm 0,5$	$11,1 \pm 1,1$	$12,9 \pm 0,3$

Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben, $p < 0,05$ ($a > b > c$).

Das Verhältnis der n6- und n3-PUFA betrug in den Erythrozyten der Kontrollgruppe 7,7:1. Im Vergleich zur Kontrolle gab es nach 39-tägiger c9,t11-CLA-reicher Diät keine Unterschiede in den prozentualen Anteilen der SFA, MUFA und PUFA (Abb. 32). Der

** einschließlich CLA

Gehalt an CLA stieg von $0,3 \pm 0,1$ % auf $2,6 \pm 0,3$ % der FSME an. Mit einem Anteil von 64 % der Gesamt-CLA war *c9,t11*-CLA wie in den anderen Matrices erwartungsgemäß das dominierende Isomere, gefolgt von *c9,c11*-CLA mit 17 % und *c11,t13*-CLA mit 5 % der Gesamt-CLA. Die Summe der n6-PUFA sank nach *c9,t11*-CLA-reicher Diät auf $34,1 \pm 1,2$ % der FSME ($p \leq 0,01$; Abb. 29 IC). Dadurch ließ sich bei gleichzeitigem Anstieg der n3-PUFA ($p \leq 0,05$) eine n6:n3-PUFA-Ratio von 5,5:1 bestimmen. Abb. 33 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Anreicherung des *c9,t11*-Isomeren in den Lipiden der Erythrozyten und dem immunologisch relevanten n6:n3-PUFA-Verhältnis, wobei es einen Sättigungseffekt zu geben schien. Die Akkumulation der C18-Monoene im Lebergewebe der CLA-Mix-Gruppe spiegelte sich deutlich in der Fettsäurenverteilung der Erythrozyten wider. Hier bildeten die MUFA mit $29,7 \pm 0,7$ % der FSME die stärkste Fraktion. Auf die 18:1*c9* entfielen $20,9 \pm 0,4$ % der FSME, die somit wie in der Leber die Hauptfettsäure des Gesamtspektrums darstellte. Entsprechend waren die PUFA gegenüber der Kontrolle und *c9,t11*-CLA-reichen Diät um 33 % bzw. 29 % reduziert, wobei dies sowohl die n3-PUFA (-19 % vs. Kontrolle und -29 % vs. *c9,t11*-CLA-Diät) als auch n6-PUFA (-39 % vs. Kontrolle und -28 % vs. *c9,t11*-CLA-Diät) betraf. Da die n6-PUFA vergleichsweise stärker sanken als die n3-PUFA, lag das n6:n3-PUFA-Verhältnis in der CLA-Mix-Gruppe mit 5,7:1 unter dem der Kontrolle und war nicht verschieden von der *c9,t11*-CLA-reichen Diät (Abb. 33). Im Vergleich zur *c9,t11*-CLA-Diät stieg der CLA-Gesamtgehalt in den Erythrozyten nach 39-tägiger Gabe der CLA-Mix-Diät nur auf $1,9 \pm 0,1$ % der FSME, wobei *c9,t11*-CLA 47 % und *t10,c12*-CLA 44 % der Gesamt-CLA bildeten.

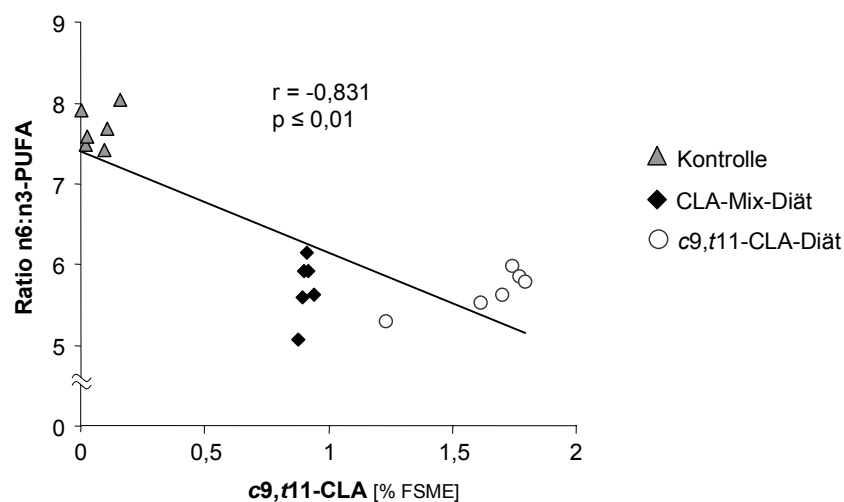


Abb. 33: Zusammenhang zwischen der Anreicherung von *c9,t11*-CLA und der n6:n3-PUFA-Ratio in den Lipiden der Erythrozyten nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten.

5 Diskussion

Die MilCHFettsäure *c9,t11*-CLA ist natürlicher Ligand des nukleären Rezeptors PPAR γ , der bei der Auflösung von entzündlichen Prozessen eine wesentliche Rolle spielt. Aus der Beobachtung heraus, dass der Konsum von Milch und Milchprodukten seit früher Kindheit vor der Entwicklung eines allergischen Bronchialasthma schützen kann, wurde das Ziel der vorliegenden Arbeit formuliert. Es sollte *in vitro* und *in vivo* geprüft werden, ob die Administration von *c9,t11*-CLA einen suppressiven Effekt auf Entzündungsparameter im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale ausübt. Desweiteren wurden die Auswirkungen der oralen Supplementation eines *c9,t11*-CLA-reichen TAG-Präparates auf die Fettsäureverteilung in lipogenen und Lipidspeicherorganen charakterisiert.

5.1 Effekte von *c9,t11*-CLA auf Entzündungsparameter *in vitro*

5.1.1 *c9,t11*-CLA hemmt die Bildung von IL-8 in BEAS-2B via PPAR γ

Traditionell wurde das Bronchialepithel in erster Linie als eine physikalische Barriere betrachtet. Heute weiß man, dass seine Funktionen wesentlich komplexerer Natur sind und ihm in der Ätiologie und Pathogenese des Asthma bronchiale eine bedeutende und aktive Rolle zukommt. Die epitheliale Desquamation in den asthmatischen Bronchien ist u.a. Folge einer Dysfunktion des Bronchialepithels im Verlauf des inflammatorischen Prozesses. Das Epithel selbst ist dabei Effektor und sezerniert eine Reihe von Entzündungsmediatoren. IL-8, auch als neutrophil activating protein (NAP-1) bezeichnet, ist ein Chemokin der CXC-Klasse, dessen Hauptaufgabe die chemotaktische Rekrutierung Neutrophiler (Yoshihara *et al.* 2006), Eosinophiler (Shute 1994), Monozyten (Gerszten *et al.* 1999) und Lymphozyten (Larsen *et al.* 1989) an den Entzündungsort ist. Bei Asthmatikern ist die Konzentration von IL-8 in den Atemwegen signifikant erhöht (Norzila *et al.* 2000). Das Chemokin wird dabei vom Atemwegsepithel selbst (Marini *et al.* 1992) oder verstärkend von extravasierten Zellen produziert (Mann & Chung 2006). Es gibt Hinweise, dass IL-8 eine direkte kontraktile Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Atemwege ausübt und somit über die Chemotaxis hinaus zur Bronchokonstriktion beiträgt (Govindaraju *et al.* 2006).

Im *in vitro*-Modell konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) mit *c9,t11*-CLA in physiologischer Konzentration (Alonso *et al.* 2003; 10 μ g/ml entsprechen 35,7 μ M) die Bildung von IL-8 auf Protein- und mRNA-Ebene im Gegensatz zu LA signifikant reduziert (Abb. 15, 16). Induziert wurde die

IL-8-Produktion durch Stimulation der BEAS-2B mit LPS und Serum von allergischen Spendern.

Obwohl die epitheliale Endotoxinexposition kein typischer Trigger für eine asthmatische Exazerbation ist, lässt sich durch Stimulation von Bronchialepithelzellen mit LPS über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 eine Zytokinantwort induzieren. Werden Pathogene von myeloiden oder epithelialen Zellen durch spezifische signalgebende Oberflächenrezeptoren erkannt, wird sofort ein Abwehrmechanismus zu deren Bekämpfung eingeleitet. Bei Säugern signalisieren zur Toll-Familie gehörende Rezeptoren (TLRs) das Vorhandensein von LPS über CD14, dem Rezeptorprotein für LPS–LBP-Komplexe (Striz *et al.* 1998). LBP (LPS-bindendes Protein) ist ein opsonierendes Akute-Phase-Protein, das LPS bindet und in katalytischer Weise die Anlagerung an CD14 vermittelt. CD14 kommt entweder zirkulierend (soluble oder sCD14) oder über eine Phosphoinosit-Glykolipidkette an die Zelloberfläche gebunden (membrane-bound oder mCD14) vor. Die Interaktion mit TLRs löst eine Kinasekaskade zur Aktivierung von NFκB und AP-1 aus, die die Transkription proinflammatorischer Gene einleiten (Schmeck *et al.* 2004 und 2006). Beispielsweise führt die p38 MAPK-katalysierte Phosphorylierung von NFκB nach bakterieller Infektion zur IL-8-Produktion in BEAS-2B (Schmeck *et al.* 2004). Vermutlich exprimieren Bronchialepithelzellen, anders als Makrophagen und Granulozyten, kein oder nur wenig mCD14, weshalb zu einer LPS-induzierten Stimulation Serum erforderlich ist, das sCD14 und LBP in stöchiometrischer Konzentration zur Bindung von LPS enthält (Pugin *et al.* 1993; Abb. 34).

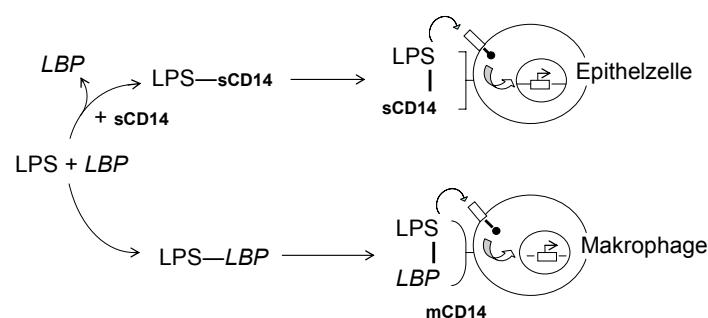


Abb. 34: Die LPS-induzierte Aktivierung von Epithelzellen benötigt zusätzlich LBP und dessen löslichen Rezeptor sCD14. Nach Pugin *et al.* 1993, modifiziert.

In der BAL und im Serum von Asthmatikern kommt es nach Allergenchallenge zu einem starken Anstieg der akzessorischen Moleküle, der mit einer Zytokinantwort verbunden ist (Dubin *et al.* 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte LPS-Konzentration orientierte sich an einer Untersuchung von Schulz *et al.* (2002), in der gezeigt wurde, dass LPS in Konzentrationen von 10 ng bis 10 µg/ml in Gegenwart von 2-10 % humanen Serums die IL-8-Produktion in BEAS-2B signifikant induziert. In eigenen Vorversuchen wurde anhand von Titrationsreihen die geeignete Konzentration von humanem Serum ermittelt, wobei Serum von allergischen Spendern deutlich stärker stimulierend auf die Zytokinproduktion wirkte als das von Nichtallergikern. Die serumspezifischen Unterschiede können bspw. durch die bei Asthmatikern erhöhten Serumwerte von Histamin, TNF- α und dessen löslichen Rezeptor sTNF- α -R, des bioaktiven Sphingolipids Sphingosin1-phosphat (SP-1) und IL-13 erklärt werden, um nur einige mögliche Faktoren zu nennen. Für Histamin wurde ein starker additiver Effekt auf die NF κ B-abhängige Produktion von IL-8 in mit TNF- α stimulierten BEAS-2B gezeigt (Holden *et al.* 2007). SP-1 induziert die IL-8-Produktion in BEAS-2B rezeptorvermittelt über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden (Cummings *et al.* 2002). Das für die Asthmagenese bedeutende IL-13 steigert die epitheliale Sezernierung von TGF- α (transforming growth factor- α) um ein Vielfaches (Booth *et al.* 2007). Dieser Wachstumsfaktor vermittelt durch EGFR-Bindung (epidermal growth factor receptor) in para- bzw. autokriner Weise nicht nur die Proliferation des Epithels, sondern führt über eine Phosphorylierungskaskade via MAPK auch zur IL-8-Produktion (Miller *et al.* 2005). EGFR-Signalwege sind ebenfalls beteiligt an TLR-assoziiierter IL-8-Induktion (Miller *et al.* 2005, Koff *et al.* 2008).

Trotz der ähnlichen Molekülstruktur (Abb. 35) wurden deutliche Unterschiede im Hemmeffekt von LA im Vergleich zu *c9,t11*-CLA auf die IL-8-Produktion in BEAS-2B festgestellt. Durch Coadministration von GW9662, einem selektiven PPAR γ -Inhibitor, wurden die fettsäurevermittelten Hemmeffekte vollständig aufgehoben (Abb. 15, 16).

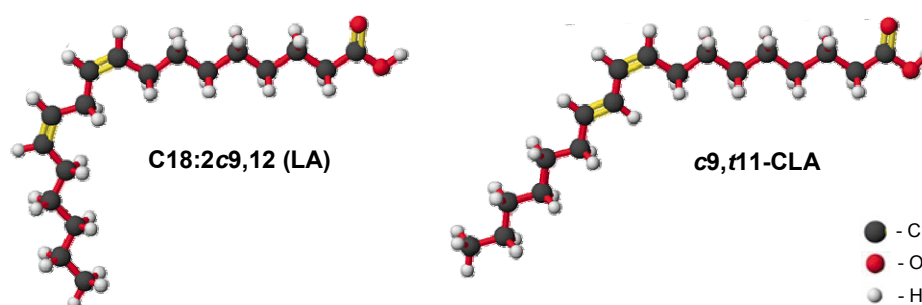


Abb. 35: Molekülstrukturen von LA und *c9,t11*-CLA. Bei der LA ist das Doppelbindungssystem an den C-Atomen 9 und 12 durch eine Methylenbrücke unterbrochen. Aus: Steinhart 1996, verändert.

Die LBD der PPARs bildet entsprechend der Molekülfaltung eine mehr oder weniger hydrophobe und verschieden große Kavität, was die Unterschiede in der Liganden-selektivität erklärt (Xu *et al.* 2001). So bindet PPAR β/δ eher kompakte Moleküle und kürzerkettige Fettsäuren während PPAR α und PPAR γ ein breites Spektrum vornehmlich großer lipophiler Moleküle und langkettiger Fettsäuren bzw. deren Metabolite binden. Auch LA und CLA zählen zu den natürlichen Liganden von PPAR α und PPAR γ (Moya-Camarena *et al.* 1999, Belury *et al.* 2002; Tab. 15).

Tabelle 15: Beispiele für PPAR-Liganden. Nach Moraes *et al.* 2006, verändert.

Isotyp	natürliche Aktivatoren	natürliche Inhibitoren	synthetische Aktivatoren	synthetische Inhibitoren
PPARα	PUFA (z.B. LA, AA, EPA, DHA) und oxidierte Derivate konjugierte Polyene wie CLA Prostanoide und Katabolite z.B. 15d-PGJ ₂ HODEs, HETEs	Thioester (Acyl-CoA)	Fibrate (z.B. Fenofibrat, Clofibrat, Gembibrozil) L-Tyrosin-Derivate (Glitazare) GW7647 WY14643 NSAIDs	MK886
PPARβ/δ	C6-8 Fettsäuren, zyklische Prostanoide z.B. PGI ₂	2-Bromo-Palmitat	Carbaprostazyklin (cPGI ₂) GW0742 GW501516	Sulindac T0070907
PPARγ	PUFA (z.B. LA, AA, EPA, DHA) und oxidierte Derivate konjugierte Polyene Prostanoide, 15d-PGJ ₂ , HODEs, HETEs	Acyl-CoA	Thiazolidindione (Glitazone, z.B. Rosiglitazon, Pioglitazon) Glitazare GW1929 CDDO NSAIDs	Diclofenac BADGE GW9662 CDDO-Me T0070907

Abkürzungen: 15d-PGJ₂ · 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, AA · Arachidonsäure, BADGE · Bisphenol-A-Diglycidylether, CDDO · 2-Cyano-3,12-Dioxooleana-1,9-Dien-28-olsäure, CDDO-Me · Methyl-CDDO, DHA · Docosahexaensäure, EPA · Eicosapentaensäure, GW0742 · 4-[2-(3-Fluoro-4-Trifluoromethyl-Phenyl)-4-Methyl-Thiazol-5-ylmethylsulfanyl]-2-Methyl-Phenoxy}-Azetat, GW1929 · N-(2-Benzoyl-phenyl)-O-[2-(Methyl-2-Pyridinylamino)Ethyl]-L-Tyrosin Hydrat, GW9662 · 2-Chloro-5-Nitro-N-Phenylbenzamid, GW501516 · 2-Methyl-4(((4-Methyl-2-(4-Trifluoromethylphenyl)1,3-Thiazol-5yl)Methyl)Sulfanyl)Phenoxy-Azetat, HODEs · Hydroxyoctadecadienol-säure, HETEs · Hydroxyeicosatetraenolsäure, MK886 · 3-(1-(p-Chlorobenzyl)-5-(Isopropyl)-3-Tert-Butylthioindol-2yl)-2,2-Dimethyl-propionsäure Methyl ester, NSAIDs · nonsteroidal anti-inflammatory drugs, T0070907 · 2-Chloro-5-Nitro-N-(4-Pyridyl)Benzimid

Obwohl LA PPAR γ aktivieren kann, wurden aufgrund ihrer biologischen Funktion als AA- und Eicosanoid-Vorläufer eher proinflammatorische Effekte mit dieser Fettsäure verbunden (\uparrow 1.1.5.4). Infolge bakterieller oder Endotoxinexposition regulieren Bronchialepithelzellen die Expression der COX-2 und die Synthese von Eicosanoiden, z.B. PGE₂, via p38-MAPK-Kaskade herauf (Ermert *et al.* 2000 und 2003, N'Guessan *et al.* 2006). Prostaglandine wie PGE₂ können – somit auch in autokriner Funktion – rezeptorvermittelt eine Entzündungsantwort in den Epithelzellen induzieren (Tavakoli *et al.* 2001). Auch die Expression von epitheliale IL-8 scheint mit der COX-2-abhängigen Produktion von PGE₂ in Verbindung

zu stehen (Takehara *et al.* 2006).

GW9662 ist ein synthetischer PPAR γ -Antagonist und -Inhibitor, der den Rezeptor irreversibel bindet, die LBD am Cys₂₈₅ kovalent modifiziert und somit die Aktivierung blockiert (Leesnitzer *et al.* 2002). *In vitro* wird die Substanz eingesetzt, um PPAR γ -medierte antiinflammatorische Effekte von CLA und anderen Fettsäuren bzw. deren Metaboliten und synthetischen Agonisten zu erklären (Marion-Letellier *et al.* 2008). Auch in *in vivo*-Studien zur allergischen Atemwegsentzündung hat sich die inhalative Applikation von GW9662 zur Mechanismuskklärung als geeignet erwiesen (Woerly *et al.* 2003, Honda *et al.* 2004).

5.1.2 C9,t11-CLA hemmt die Aktivierung von Eosinophilen

Die der AHR zugrundeliegende Atemwegsentzündung ist geprägt durch u.a. IL-8-induzierte, gerichtete leukozytäre Infiltration und Akkumulation, wobei die eosinophilen Granulozyten als die wesentlichen Effektorzellen der allergischen Entzündung angesehen werden. Sie sind befähigt, nach Aktivierung durch z.B. lymphozytäre Zytokine (IL-3, IL-5, GM-CSF) eine Reihe von präformierten toxischen Proteinen oder *de novo* synthetisierten proinflammatorischen Mediatoren zu sezernieren, die zur Gewebeschädigung (z.B. MBP, ECP, Sauerstoffradikale), zur Bronchokonstriktion und Schleimsekretion (z.B. EPO, LTC₄), zur Verstärkung der Entzündung (z.B. IL-6) und zur autokrinen Aktivierung und Chemotaxis weiterer Eosinophilen (IL-5) beitragen (Makino & Fukuda 1995, Hamelmann & Gelfand 2001). Bei Aktivierung steigt die Expressionsdichte eosinophiler Oberflächenantigene wie CD13 und CD69 stark an. Das auch als Aminopeptidase N (APN) bezeichnete Antigen CD13 ist ein homodimeres Transmembran-Glykoprotein aus zwei 150 kDa schweren, nicht-kovalent assoziierten Untereinheiten. Nach Aktivierung wird CD13 von den meisten Zellen myeloiden Ursprungs exprimiert. In Monozyten bspw. induziert die Quervernetzung von CD13 die Sekretion chemotaktischer Zytokine (Santos *et al.* 2000). In der BAL von Asthmatikern ist die Anzahl CD13-tragender Eosinophile nach Allergenprovokation signifikant erhöht (Braun *et al.* 2003). CD13 reguliert u.a. die Aktivierung von T-Zellen, seine Inhibition hat immunsuppressive Effekte (Reinhold *et al.* 2007). CD69, auch als activation inducer molecule (AIM) bezeichnet, ist ein 60 kDa schweres Glykoprotein aus einer 27 kDa- und einer 33 kDa-Untereinheit. Das schnell induzierbare Oberflächenantigen wird von einer Reihe myeloider Zellen exprimiert und stimuliert bspw. T-Zellen in der frühen Aktivierungsphase zur Proliferation und Differenzierung (Ziegler *et al.* 1994). Nach Allergenprovokation ist die Zahl CD69-tragender eosinophiler Granulozyten in der BAL deutlich erhöht (Julius *et al.* 1999) und korreliert mit der Stärke der Entzündung in den

Atemwegen (Wang H *et al.* 2006).

Im *in vitro*-Modell konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von eosinophilen Granulozyten aus dem Blut von allergischen Spendern mit *c9,t11*-CLA (10 µg/ml) die zytokininduzierte Expression von CD13 und CD69 signifikant reduziert (Abb. 18, 19).

In vitro kann die Expression der Oberflächenantigene CD13 und CD69 auf Eosinophilen durch Stimulation mit IL-5 induziert werden (Braun *et al.* 2003, Wedi *et al.* 1997). IL-5 spielt eine Schlüsselrolle bei allergischer Eosinophilie. Dieses Th2-Zytokin, das auch in autokriner Funktion von eosinophilen Granulozyten selbst gebildet wird, ist nicht nur spezifischer Differenzierungs-, Wachstums- und Überlebensfaktor für Eosinophile, sondern fördert auch die Adhäsionsfähigkeit und induziert die Degranulierung zytotoxischer Proteine. Bei asthmatischen Patienten steigt der Anteil Eosinophiler eines hyperadhäsiven Phänotyps mit der IL-5-Konzentration in der BAL (Johansson *et al.* 2008). Neben IL-5 sind IL-3 und GM-CSF starke Induktoren von eosinophilen Aktivierungsmarkern und erhöhen darüber hinaus die Vitalität der Eosinophilen (Wedi *et al.* 1997). Auch durch Stimulation mit IL-4 und IL-13 kann die eosinophile CD69-Expression induziert werden, wobei die Costimulation mit TNF- α die Aktivierungsantwort verstärkt (Luttmann 1999). Dass die Regulation der CD69-Expression u.a. dem Einfluß von PPAR γ unterliegt, ist mittlerweile bekannt. Matsuwaki *et al.* (2005) konnten zeigen, dass in die Hemmung der IL-5-induzierten CD69-Expression und Sezernierung des eosinophilen neurotoxischen Proteins EDN PPAR γ -vermittelte Mechanismen involviert sind.

Ein weiteres toxisches Protein ist das basische ECP, das aus den Granula aktivierter Eosinophiler freigesetzt wird und zur Schädigung des umgebenden Gewebes führt. So entstehen die mit AHR assoziierten charakteristischen Gewebsläsionen im Atemwegsepithel (Oddera *et al.* 1996).

Die induzierte Produktion von ECP in der Co-Kultur (3.1.6) konnte durch Supplementation des Mediums mit *c9,t11*-CLA nur tendenziell reduziert werden (Abb. 20; ↑ 5.4.1).

5.2 Effekte der *c9,t11*-CLA-reichen Diät auf die Ausbildung von allergischer Atemwegsentzündung *in vivo*

In dieser Arbeit wurde der BALB/c-Mausstamm als Modell für allergische Atemwegsentzündung ausgewählt, weil er ausgehend von der Definition und den klinischen Gegebenheiten von Asthma bronchiale die folgenden immunologischen Charakteristika aufweist: Immunisierungserfolg mit erhöhter IgE-Produktion, frühe Atemwegsreaktion mit generalisierter Bronchokonstriktion und Hypersekretion nach Allergenexposition (EAR), bronchiale Hyperreagibilität gegenüber unspezifischen Stimuli (z.B. Metacholin, Histamin), späte Atemwegsreaktion mit erneuter Obstruktion (LAR), Eosinophilie in der späten allergischen Phase, unspezifische *in vitro*-AHR von Lungen- oder trachealem Gewebe und effektiver Einfluss therapeutischer Interventionen (Cieslewicz *et al.* 1999, Hamelmann *et al.* 1999, Crosby *et al.* 2002, Hussain *et al.* 2004, Liu *et al.* 2006). Auch wurden an diesem Modell erfolgreich physiologische und immunologische Studien mit CLA-supplementierten Diäten durchgeführt (Hayman *et al.* 2002, Kim & Chung 2003, Yang & Cook 2003). Allerdings liegt die generelle Limitation von Tiermodellen darin, dass die speziesabhängigen Unterschiede im Krankheitsverlauf eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf die klinische Situation des Patienten nicht ohne kritische Bewertung erlauben. Dennoch bietet das Tiermodell eine gute Möglichkeit, zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen aufzuklären und präventive und therapeutische Ansätze zur Krankheitsbehandlung *in vivo* zu testen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *c9,t11*-CLA-reiche Diät in Abhängigkeit von Startzeitpunkt und Fütterungsdauer den allergeninduzierten Anstieg der Immunglobulinkonzentration im Plasma (Abb. 22), die Entwicklung von unspezifischer AHR (Abb. 23) und IL-5-assoziierte pneumonale Eosinophilie (Abb. 24, 25) inhibiert bzw. reduziert. Die *c9,t11*-CLA-vermittelte Wirkung auf die humorale, funktionale und zelluläre Immunantwort wurde begleitet von einer deutlichen Hemmung phänotypischer bronchialer Alterationen, wie verstärkte Mukusakkumulation (Abb. 26).

5.2.1 *C9,t11*-CLA hemmt die allergische Sensibilisierung

Die inapprobate Immunglobulin-Produktion nach Allergenkontakt ist Grundvoraussetzung für die Entstehung der »early asthmatic reaction« (EAR), dem Bronchospasmus. Th2-Zytokine induzieren die spezifische Produktion von IgE und IgG1, die an hochaffine Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten binden und nach Allergenkontakt

die Degranulierung und Sezernierung vasoaktiver und bronchokonstriktorischer Mediatoren einleiten. IgG2a hingegen wird von Th1-Zellen in akut inflammatorischen Zuständen induziert und vermittelt die antikörperabhängige zytotoxische Immunreaktion und Komplementaktivierung (Mosmann & Sad 1996).

Die Fütterung der *c9,t11*-CLA-reichen Diät vor und während der Sensibilisierung zeigte im Modell Primäre Prävention sowohl auf die Ausbildung einer Th2-abhängigen als auch einer Th1-assoziierten Immunantwort einen suppressiven Effekt (Abb. 22 IA-D).

In einer ähnlich angelegten Studie wie die hier präsentierte reduzierte die Gabe einer *c9,t11*-CLA-reichen Milchfettdiät zwei Wochen vor und über den Zeitraum der allergischen Sensibilisierung und Induktion einer Atemwegsinflammation signifikant die Serumkonzentration von spezifischem IgE und IgG1 (Kanwar *et al.* 2007). Hammad *et al.* zeigten im *in vivo*-Asthmamodell, dass die antigenpräsentierende Kapazität von DC durch PPAR γ -Agonisten inhibitorisch beeinflusst wird und es in den beteiligten T-Zellen zum starken Anstieg des immunregulatorischen Zytokins IL-10 kommt (Hammad *et al.* 2004). IL-10 wirkt sowohl hinsichtlich des Th2- als auch des Th1-Primings hemmend auf die akzessorische Funktion der DC (Bellinghausen *et al.* 2001, Haase *et al.* 2002). In Gegenwart von IL-10 lassen sich toleranzinduzierende DC generieren, die in T-Zellen Anergie auslösen (Steinbrink *et al.* 1997). Die Differenzierung von CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) lässt sich zusätzlich durch TGF- β fördern, was eine signifikante Suppression der Th2-Antwort zur Folge hat (Bellinghausen *et al.* 2006). Inwieweit CLA das Verhältnis der T-zellulären Zytokinantwort modulieren, kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht geschlossen werden. Allerdings zeigten Bassaganya-Riera *et al.*, dass oral verabreichte CLA PPAR γ -vermittelt ebenfalls Th1-assoziierte inflammatorische Prozesse hemmen, was u.a. mit der Induktion von TGF- β (Bassaganya-Riera *et al.* 2004) und vermutlicherweise mit einer PPAR γ -abhängigen Stimulation der Foxp3-exprimierenden T_{reg}-Population (Hontecillas & Bassaganya-Riera 2007, Wohlfert *et al.* 2007) einhergeht. Noch unklar ist, ob CLA andere T-Zellpopulationen wie z.B. Th17 beeinflussen, die beim Asthma ebenfalls eine Rolle spielen (Traves & Donnelly 2008).

Whigham *et al.* vermuteten, dass die CLA-vermittelte Reduktion von PGE₂ ein entscheidender Faktor für die Hemmung der allergischen Sensibilisierung ist (Whigham *et al.* 2001). Im gesunden Organismus scheint die orale Intervention mit CLA die spontane IgE-Produktion zu hemmen, während IgA und IgM ansteigen (Sugano *et al.* 1998, Song *et al.* 2005). In diesen Studien wurde allerdings ein *t10,c12*-CLA-enthaltendes Präparat eingesetzt und es gibt Hinweise, dass das *t10,c12*-Isomere für den Anstieg der unstimulierten

Ig-Produktion verantwortlich ist (Yamasaki *et al.* 2003).

5.2.2 *c9,t11*-CLA hemmt die allergische Atemwegsentzündung

5.2.2.1 Die Rolle von PPAR γ

Die kardinalen Symptome des allergischen Asthma bronchiale (Atemwegsentzündung, AHR und Obstruktion) entwickeln sich in einem Th2-dominierten Zytokinmilieu, in dem vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 wesentliche Rollen spielen. Das Vorhandensein von IL-4 und IL-13 ist essentiell für die spezifische Produktion von IgE (Geha *et al.* 2003). Während IL-4 darüber hinaus die Th2-Antwort aufrecht erhält und verstärkt (Swain *et al.* 1990), determiniert IL-13 die Ausbildung von AHR (Walter *et al.* 2001), ist an der Hypersekretion schleimproduzierender Zellen beteiligt (Kuperman *et al.* 2002) und vermittelt eine progrediente Fibrose als Form einer Ersatzwundheilungsreaktion (rev. in: Kasaian & Miller 2008). IL-5 ist ein hauptverantwortliches Zytokin für die pulmonale Eosinophilie (Hamelmann & Gelfand 2001). Da nach *c9,t11*-CLA-reicher Diät im Ansatz Primäre Prävention die typischen Symptome einer Th2-getriebenen asthmatischen Reaktion reduziert waren, PPAR γ -Aktivierung die Ausbildung der Th2-assoziierten Immunantwort im Asthmodell hemmt (Mueller *et al.* 2003, Woerly *et al.* 2003, Honda *et al.* 2004) und der Hemmeffekt durch Coadministration von GW9662 vor und während der Atemwegs-challenges größtenteils aufgehoben wurde (Abb. 23 I-26 I), erscheint eine PPAR γ -vermittelte Wirkungsweise der CLA plausibel. Die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps in der immunisierten Kontrollgruppe im Ansatz Primäre Prävention war positiv assoziiert mit einer signifikanten Downregulation der PPAR γ -mRNA im Lungengewebe (Abb. 27 I). Im Gegensatz dazu waren die Expressionslevel in den Lungen der immunisierten Tiere der *c9,t11*-CLA-Gruppe nicht verschieden von denen der scheinimmunisierten Kontrollgruppe. Dies impliziert, dass zwischen der Entwicklung von allergischer Atemwegsentzündung und der Expression von PPAR γ ein inverser und kausaler Zusammenhang existiert (Kobayashi *et al.* 2005). Diese Annahme wird unterstützt von der Beobachtung, dass sich durch Applikation von GW9662 der asthmatische Phänotyp wiederherstellen ließ bei gleichzeitiger Suppression der pulmonalen PPAR γ -mRNA (Abb. 27 I). Diese Daten unterstützen weiterhin frühere Beobachtungen, dass die zytokininduzierte Downregulation von PPAR γ durch PPAR γ -Liganden verhindert werden kann (Tanaka *et al.* 1999), womit *c9,t11*-CLA eine regulatorische Rolle bei der mRNA-Expression von PPAR γ zukäme. Da die systemische PPAR γ -Defizienz *in vivo* lethal ist (Gray *et al.* 2005), wurde die GW9662-Behandlung in unserem wie in früheren Modellen auf die Lunge beschränkt

(Woerly *et al.* 2003, Honda *et al.* 2004). Dies limitiert die Aussage zum Mechanismus der Entzündungshemmung durch *c9,t11*-CLA und liefert keinen direkten Beweis für einen systemischen Effekt. Dennoch, da die CLA dem physiologischen Metabolismus entsprechend im Körper akkumulierten (Abdominalfett, Leber, Erythrozyten, Lunge, Milz) und sich ein negativer Zusammenhang mit der allergenspezifischen Proliferation der Splenozyten abzeichnete (Abb. 28), ist ein systemischer Effekt auf die Immunantwort durchaus denkbar. Auch weil die lokale Applikation des Rezeptorblockers den CLA-assoziierten Hemmeffekt auf den eosinophilen Influx und die AHR bei Provokation mit hoher Mch-Konzentration nicht vollständig aufhob (Abb. 24 I und 23 I), könnte ein zusätzlicher CLA-Effekt zugrundeliegen, wie die Reduktion der eicosanoidpräkursorischen *n6*-PUFA.

5.2.2.2 Die Rolle der *n6*-PUFA

Die Analyse der Fettsäurenverteilung ergab, dass sich der Anteil der *n6*-PUFA in den Geweben nach *c9,t11*-CLA-reicher Diät signifikant verminderte (Abb. 28 B-D, Abb. 29). Diese Reduktion war vergleichsweise stärker als der Einbau der CLA und signifikant sowohl für die 39-tägige als auch die 16-tägige Fütterungsdauer der *c9,t11*-CLA-reichen Diät.

Oxidisierte Metabolite der AA spielen eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Migration von Immunzellen, Immunglobulin- und Th1/Th2-Zytokinregulation und Makrophagenaktivierung, scheinen in hoher Konzentration aber auch immunsuppressiv zu wirken (rev. in: Harbige 2003). Die AA kann nach Freisetzung durch die membranständige Phospholipase A₂ in zwei Reaktionswegen modifiziert werden. Die Lipoxygenase (LOX) katalysiert die Umsetzung zu Leukotrienen, die bereits in geringsten Mengen als Mediatoren der Entzündung bzw. der allergischen Reaktion wirken. Die Synthese der Prostanoiden katalysiert die Cyclooxygenase, von der zwei Isoformen bekannt sind: die konstitutive COX-1 ist für die Produktion von Prostanoiden verantwortlich, die physiologische Funktionen im Körper übernehmen. COX-2 wird durch einen Entzündungsstimulus in Endothel-, Epithel- und immunkompetenten Zellen induziert und sorgt für die gesteigerte Synthese von Prostanoiden im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Während der Exazerbation führen PGD₂ und PGF₂ in synergistischer Weise zur Bronchokonstriktion (Park & Christman 2006). LTC₄, D₄ und E₄ verstärken darüber hinaus die Schleimsekretion (McMillan 2001). Vor diesem Hintergrund ergibt sich die mit *n6*-PUFA assoziierte proinflammatorische Wirkung größtenteils aus deren biologischer Bedeutung als Eicosanoid-Vorläufer (↑ 1.1.5.4). *C9,t11*-CLA vermindert nicht nur den zellulären Anteil der *n6*-PUFA,

möglicherweise durch Hemmung der Konversion von LA zu AA (Chuang *et al.* 2001 und 2004), sondern ist als potenter Inhibitor des COX- und LOX-Enzymsystems beschrieben worden (Bulgarella *et al.* 2001, Yu *et al.* 2002, Ringseis *et al.* 2006, Ochoa *et al.* 2004) und inhibiert darüber hinaus die Expression von Prostaglandinrezeptoren (Wang LS *et al.* 2006). Hinsichtlich der lymphozytären Funktion sind auch eicosanoidunabhängige pro-inflammatorische Mechanismen der n6-PUFA bekannt. Lymphozyten inkorporieren während ihrer Reifung präferentiell AA und LA in die Membranphospholipide, v.a. in das Phosphatidylethanolamin (Calder *et al.* 1994). Da T-Zellen keinen wesentlichen Beitrag zur Eicosanoidsynthese leisten (Goldyne & Strobo 1982), liegt die Bedeutung des hohen Anteils der AA in den Membranphospholipiden wahrscheinlich in der funktionalen Integrität im Rahmen der Immunregulation durch Zytokinbildung. Mit einem Anteil von ca. 25 % der Gesamtfettsäuren beeinflusst die AA durch ihre hohe Flexibilität entscheidend die Membranfluidität. Dies hat u.a. Konsequenzen für die TCR-MHC-II-Interaktionen während der Antigenpräsentation und downstream für die Signaltransduktion (rev. in: Harbige 2003). C9,t11-CLA akkumuliert konzentrationsabhängig und auf Kosten der AA in der Zellmembran bzw. hemmt die Integration von AA in die Phospholipide (Ringseis *et al.* 2006, Urquhart *et al.* 2002).

5.3 Metabolische Wirkungen der PPAR-Aktivierung

5.3.1 Beispiele für PPAR-Liganden und ihre funktionellen Rollen

Die metabolischen Wirkungen von CLA ähneln nicht nur denen von synthetischen PPAR γ -sondern auch PPAR α -Aktivatoren. Zu den pharmakologisch relevanten Agonisten von PPAR α gehört die Substanzklasse der Fibrate, die bei Hyper- und Dyslipidämie zur Senkung der TAG- und LDL-Cholesterolkonzentration eingesetzt werden und mit deren Behandlung die Inzidenz von Myokardinfarkten signifikant reduziert werden kann (Tenenbaum *et al.* 2005). In der Leber stimulieren PPAR α -Liganden die Fettsäureaufnahme und -utilisation bspw. durch Induktion des Fettsäuretransporters FATP, der Acyl-CoA-Synthetase, der Acyl-CoA-Oxidase, der Ketoacyl-CoA-Thiolase und des bifunktionalen Enzyms (Martin *et al.* 1997, Frederiksen *et al.* 2004). Darüber hinaus erhöhen sie die Lipoproteinlipolyse durch gesteigerte LPL-Aktivität und Reduktion der ApoCIII-Expression und beeinflussen den HDL-Metabolismus positiv durch Stimulation der ApoAI- und -AII-Expression (rev. in Staels *et al.* 1998; Abb. 36). In ihrer hypolipidämischen Funktion werden die Fibrate von den Thiazolidindionen (TZD) unterstützt, einer Substanzklasse aus fettsäureähnlichen PPAR γ -

Aktivatoren. Ein Haupteffekt von PPAR γ -Agonisten ist die Erhöhung der peripheren Insulinsensitivität, daher finden TZD in erster Linie Anwendung in der Behandlung von Typ-II-Diabetes.

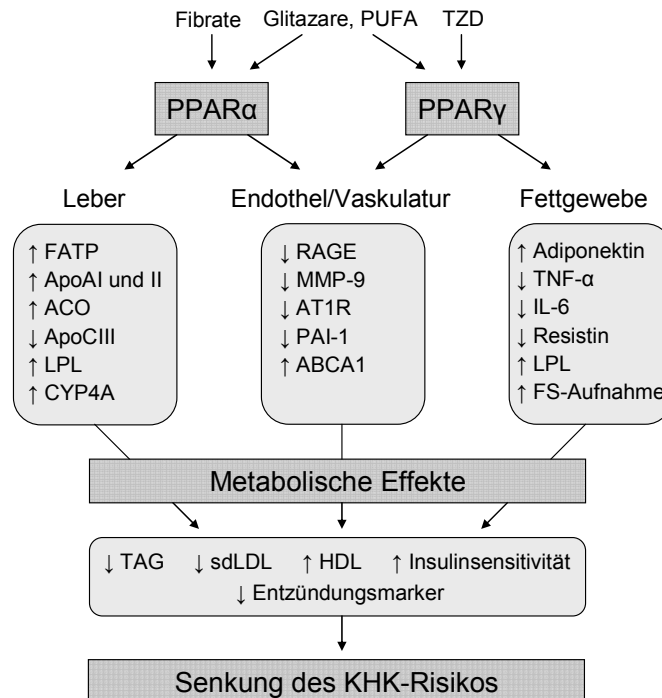


Abb. 36: Metabolische Effekte von PPAR-Agonisten. Duale Aktivierung von PPAR α und PPAR γ resultiert in der Senkung der Blutlipide, in der Verbesserung des LDL:HDL-Verhältnisses und in einer gesteigerten Glukoseverwertung der Muskeln. ↑ = Anstieg, ↓ = Abfall, nach Chinetti-Gbaguidi *et al.* 2005, verändert

Abkürzungen: ABCA1 · ATP-Binding Cassette A1, ACO · Acetyl-CoA-Oxidase, Apo · Apolipoprotein, AT1R · Typ 1 Angiotensin-II-Rezeptor, CYP4A · Cytochrom P450 4A, FATP · Fatty Acid Transport Protein, FS · Fettsäuren, HDL · High Density Lipoprotein, LPL · Lipoproteinlipase, MMP-9 · Matrix-Metalloproteinase-9, PAI-1 · Plasminogen Activator Inhibitor Type 1, RAGE · Receptor of Advanced Glycosylation End-products, sdLDL · Small Dense Low Density Lipoprotein, TAG · Triacylglycerol

Die zentrale Rolle zur Vermittlung der antidiabetischen Effekte spielt das viszerale Fettgewebe. PPAR γ ist nicht nur essentieller Regulator der Adipogenese und Adipozytendifferenzierung sondern auch der Glukosehomöostase *in vivo* (Tarcin *et al.* 2007). Die Ligandenbindung des Rezeptors führt zur verstärkten adipozytären Expression von Adiponektin, das über die AMPK-Signalkaskade die periphere Fettsäureoxidation stimuliert (Yoon *et al.* 2006, Misra 2008). Gleichzeitig wird die PI₃-Kinase aktiviert, woraufhin der GLUT-4 zur Zelloberfläche transloziert und die Glukoseaufnahme in die Zelle ansteigt (Kausch *et al.* 2001, Yonemitsu *et al.* 2001). Darüber hinaus hemmen PPAR γ -Liganden die Bildung des Adipozytenhormons Resistin und der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α (Hammarstedt *et al.* 2005; Abb. 36), die mit zellulärer Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden: Resistin und IL-6 induzieren die Expression von SOCS-3, das die intrinsische Kinaseaktivität des Insulinrezeptors blockiert

(Senn *et al.* 2003, Steppan *et al.* 2005), während TNF- α die inhibitorische Phosphorylierung und letztlich Degradation der Insulinrezeptor-Substrate vermittelt (de Alvaro *et al.* 2004). Sowohl für PPAR α - als auch PPAR γ -Aktivierung wurden antiatherosklerotische Effekte beschrieben. Die duale PPAR-Aktivierung unterstützt den ApoAI-HDL-vermittelten reversen Cholesteroltransport durch Stimulation der hepatischen ABCA1-Expression (Tanabe *et al.* 2007). Außerdem inhibieren PPAR α - und PPAR γ -Agonisten die Extravasation und Akkumulation von Monozyten in der arteriellen Intima einerseits durch Reduktion der endothelialen mRNA-Level des Chemoattraktants MCP-1 und der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 (Dragomir *et al.* 2006, Seki *et al.* 2005, Pasceri *et al.* 2000), andererseits durch Hemmung der insulininduzierten proteolytischen Aktivität der monozytären MMP-9 (Shu *et al.* 2000, Kappert *et al.* 2008). Ein weiterer Hemmeffekt involviert die RAGE-vermittelte hyperplastische Wirkung von diabetesassoziierten glykosylierten Proteinen und Lipoproteinen in der Arterienwand, den sog. AGE (Wang K *et al.* 2006; Abb. 36). Durch Suppression der Plättchenaggregation und Erhöhung der fibrinolytischen Aktivität können PPAR γ -Aktivatoren eine antithrombotische Wirkung entfalten (Borchert *et al.* 2007, Hong *et al.* 2003). Für PPAR α wurde dies nicht gezeigt, allerdings scheinen die erhöhten PAI-1-Level im Rahmen der Arteriosklerose mit Veränderungen des PPAR α -Gens in Verbindung zu stehen (Zak *et al.* 2005). PPAR γ -Agonisten können blutdruckstabilisierend und inhibierend auf die vaskuläre Proliferation wirken, indem sie den Angiotensin-II-Rezeptor des Typs 1 herabregulieren (Sugawara *et al.* 2001). Auch hierfür scheint es hinsichtlich der Atherogenese PPAR α -Polymorphismen zu geben (Balcerzyk *et al.* 2007). Selektive PPAR β/δ -Agonisten erhöhen die HDL-Cholesterol- (Sprecher *et al.* 2007) und senken die LDL- und TAG-Konzentration im Plasma (Risérus *et al.* 2008), was darauf hindeutet, dass dieser Rezeptorisoform ebenfalls eine wichtige Bedeutung in der Lipid- und Glukosehomöostase zukommen könnte. Dies wird unterstützt von der Beobachtung, dass PPAR β/δ -defiziente Mäuse nachhaltige Dysfunktionen der Fett- und Glykogenspeicherung und bei der Wundheilung entwickeln (Mandard *et al.* 2007, Man *et al.* 2008). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine entzündungshemmende Wirkung von PPAR β/δ in Adipozyten (Rodriguez-Calvo *et al.* 2008).

5.3.2 Metabolische Wirkungen von 9,11-Isomeren der CLA

Nach 39-tägiger Fütterung einer *c9,t11*-CLA-reichen Diät wurden im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede im Organgewicht und Fettgehalt der Lebern und des abdominalen Fettgewebes festgestellt (Abb. 31). Im Gegensatz zur CLA-Mix-Diät waren die

Auswirkungen der *c9,t11*-CLA-reichen Diät auf die Verteilung der Fettsäuren in den analysierten Organen/Geweben weniger stark (Tab. 12-14) und hinsichtlich der Reduktion der *n6*-PUFA sogar positiv zu bewerten (Abb. 28, 29, 33). Die 9,11-Isomeren akkumulierten in den Organen in einem dem supplementierten Öl entsprechenden Verhältnis.

In einer kürzlich erschienenen Studie von Tholstrup *et al.* (2008) reduzierte die Gabe eines *c9,t11*-CLA-reichen Öls im Gegensatz zu einem CLA-Mix-Präparat die Plasmakonzentration von verschiedenen atherogenen Markern wie CRP, Fibrinogen und PAI-1. Im Arteriosklerosemodell erhöhte eine *c9,t11*-CLA-reiche Diät den reversen Cholesteroltransport durch Induktion der arteriellen ABCA1-Expression und hemmte die Cholesterolablagerung und den LDL-Peroxidationsindex sowie die Expression von COX-2, ICAM-1 und IL-1 β in der Aorta (Valeille *et al.* 2006). Tricon *et al.* zeigten, dass *c9,t11*-CLA im Gegensatz zu *t10,c12*-CLA die LDL:HDL-Ratio sogar in gesunden Erwachsenen reduziert (Tricon *et al.* 2004). Im Diabetesmodell hemmte eine *c9,t11*-CLA-reiche Diät die Transaktivierung von NF κ B und damit verbunden die Expression von TNF- α und die Makrophagenakkumulation im Fettgewebe. Gleichzeitig sank die Plasmakonzentration von Nüchtern glukose, Insulin und TAG infolge des Anstiegs der Insulinrezeptor- und GLUT-4-Expression (Moloney *et al.* 2007).

Zu den metabolischen Effekten von anderen 9,11-Isomeren als dem *c9,t11*-Isomeren ist bisher wenig bekannt. Einige Arbeiten an *in vitro*-Krebsmodellen deuten darauf hin, dass *t9,t11*- und *c9,c11*-CLA größeres proliferationshemmendes Potential als *c9,t11*- und *t10,c12*-CLA besitzen (De la Torre *et al.* 2005, Beppu *et al.* 2006, Coakley *et al.* 2006).

5.3.3 Effekte von *t10,c12*-CLA im Fettstoffwechsel

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich *in vivo* nach 39-tägiger Gabe einer Diät, die 0,5 % *t10,c12*-CLA enthielt (w/w), eine Lipodystrophie ausbildete. Einerseits wurde eine drastische Reduktion des Abdominalfettes, andererseits eine starke Vergrößerung der Lebern mit unphysiologischer Fettakkumulation beobachtet. Die Analyse des Fettsäurenspektrums zeigte, dass die C18:1 $c9$ mit ca. 50 % der detektierten FSME die Hauptfettsäure der hepatischen Lipide bildete (\uparrow 9.2). Hieraus ergab sich ein signifikant erhöhter hepatischer SCD-Index im Vergleich zur Kontrolle und *t10,c12*-CLA-freien Diät (\uparrow Tab. 13).

In den letzten zwei Jahrzehnten haben die Inzidenz und Prävalenz von Übergewicht und Adipositas stark zugenommen. In Deutschland sind heute 70 % der männlichen und 50 %

der weiblichen Erwachsenen betroffen (Mensink *et al.* 2005). Die hieraus resultierenden medizinischen Kosten und Folgekosten beliefen sich im Jahr 2004 auf 117 Mill. Euro (Statistisches Jahrbuch Gesundheit, BMGS 2004). Im Zuge dieses alarmierenden epidemischen Trends haben sich sog. »Functional Foods« etabliert, die das wachsende Gesundheitsbewusstsein berücksichtigen und gleichzeitig große Verbraucherakzeptanz erfahren. Vor dem Hintergrund wissenschaftlich basierter Erkenntnisse werden CLA-Produkte als kurzfristig wirksame körperfettreduzierende Nahrungssupplemente freiverkäuflich angeboten (Gaullier *et al.* 2007, Watras *et al.* 2007). Diese Produkte enthalten zumeist das *c9,t11*- und das *t10,c12*-CLA-Isomere zu gleichen Teilen. Allerdings wurden in einigen Studien, in denen die Sicherheitsaspekte einer CLA-Supplementation beleuchtet wurden, bedenkliche metabolische Wirkungen offenbar, z.B. eine gesteigerte Insulinresistenz (Risérus *et al.* 2002a) verbunden mit erhöhtem oxidativen Stress und Entzündungsbiomarkern (Risérus *et al.* 2002b, Tholstrup *et al.* 2008). Proinflammatorische und prodiabetische Effekte, die eindeutig mit dem *t10,c12*-CLA-Isomeren in Verbindung gebracht werden konnten, wurden bereits in Tierstudien beschrieben und waren eng assoziiert mit einem lipodystrophischen Phänotyp. Nach Fütterung einer *t10,c12*-CLA-reichen Diät wurde zwar tatsächlich eine beträchtliche Reduktion des Körperfettes beobachtet, jedoch entwickelten diese Tiere (Mäuse) gleichzeitig eine Hepatomegalie mit Steatose (Park *et al.* 1999, Tsuboyama-Kasaoka *et al.* 2000, Clément *et al.* 2002, Kelley *et al.* 2004, Poirier *et al.* 2006). Über die zugrundeliegenden Mechanismen wird kontrovers diskutiert. Dem *t10,c12*-CLA-vermittelten antiadipogenen Effekt scheint nicht primär eine Hemmung der Aktivität lipogener Enzyme oder eine gesteigerte Lipolyse zu unterliegen (Zabala *et al.* 2006a, Lasa *et al.* 2008). Vielmehr scheinen proapoptotische und inflammatorische Mechanismen involviert zu sein, in deren Zentrum die NFκB-abhängige Bildung von TNF-α, IL-6 und IL-8 steht (Tsuboyama-Kasaoka *et al.* 2000, Chung *et al.* 2005). Diese können ihrerseits die adipozytäre Expression der Proteine SOCS-3 und JNK induzieren, was letztlich zur Hemmung der Insulintransduktion und damit zur Förderung eines prodiabetischen Status führt (Poirier *et al.* 2006). Während die zirkulierenden Fettsäuren anscheinend verstärkt im Muskel oxidiert werden (Ribot *et al.* 2007), akkumulieren sie in der Leber, wo die Fettsäurenneusynthese gleichzeitig ansteigt (Degrace *et al.* 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass *t10,c12*-CLA die Expression von ca. 400 Genen in der Leber beeinflusst, wobei etliche Enzyme mit Schlüsselrollen in der β-Oxidation gehemmt und solche in der *de novo*-Synthese induziert wurden (Rasooly *et al.* 2007). Obwohl *t10,c12*-CLA ebenfalls zu den

PPAR-aktivierenden Fettsäuren gehört (Belury *et al.* 2002), scheinen ihren metabolischen Wirkungen PPAR-abhängige und -unabhängige Mechanismen zu unterliegen (Warren *et al.* 2003, Miller *et al.* 2008). Wahrscheinlich liegt der Ausgangspunkt der *t10,c12*-CLA-vermittelten hepatischen Veränderungen sogar in der Hemmung und Downregulation von PPAR α (Warren *et al.* 2003, Rasooly *et al.* 2007), äquivalent zur Suppression von PPAR γ in Adipozyten und im viszeralen Fettgewebe (Evans *et al.* 2001, Brown *et al.* 2003, Kang *et al.* 2003, Poirier *et al.* 2006). Jüngsten Erkenntnissen zufolge ist die Suppression von PPAR α die integrierte Antwort auf zellulären Stress, z.B. durch Lipidperoxidation, in deren Verlauf die eIF2 α -Kinasekaskade zur Aktivierung von NF κ B führt (LaRosa *et al.* 2007). PPAR α -Hemmung bedingt die Hemmung der β -Oxidation und resultiert in der Überexpression des Transkriptionsfaktors SREBP-1 (Yoshikawa *et al.* 2003), der eine Vielzahl von Genen kontrolliert, die in der hepatischen *de novo*-Lipogenese von Bedeutung sind. Takahashi *et al.* (2003) zeigten, dass es durch die Fütterung einer CLA-Mix-Diät zum signifikanten Anstieg der SREBP-1-Expression in der murinen Leber kommt. Zu den von SREBP-1 kontrollierten Genen gehört das für die Diacylglycerol-Acyltransferase (DGAT) kodierende Gen. Degrace *et al.* (2003) zeigten, dass DGAT nach oraler Gabe von *t10,c12*-CLA signifikant induziert wurde. Kelley *et al.* (2004) detektierten bei der Analyse des Fettsäurenspektrums der Lebern von *t10,c12*-CLA-gefütterten Mäusen, in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten (Tab. 13), hauptsächlich Monoenfettsäuren. Monoene wie die C18:1c9 sind bevorzugte Substrate der DGAT, die den letzten Schritt in der TAG-Synthese katalysiert. Die Rate der Monoen-Biosynthese aus Acyl-CoA-Substraten wird durch die Aktivität der Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) determiniert, die ebenfalls von SREBP-1 kontrolliert wird. SREBP-1 ist insulin- und glukosesensitiv (Osborne 2000, Shimano 2001) und u.a. induzierbar durch TNF- α (Endo *et al.* 2007) und IL-6 (Gierens *et al.* 2000). Die nach *t10,c12*-CLA-Gabe beobachteten phänotypischen Veränderungen der Leber scheinen somit untrennbar mit den entzündlichen Prozessen im Fettgewebe verbunden zu sein. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass eine *t10,c12*-CLA-Diät die adipozytäre mRNA-Expression und die Level von zirkulierendem Leptin und Adiponektin signifikant vermindert, die zusätzlich wichtige Regulatoren des Insulinstoffwechsels sind und deren Fehlen einen prodiabetischen Status begünstigt (Ide 2005, Poirier *et al.* 2006). Die Konsequenzen aus einem gestörten Fettstoffwechsel betreffen nicht nur das Fettgewebe und die Leber, sondern auch andere lipogene Organe bzw. Gewebe, wie milchbildende Drüsen. So wurde an *t10,c12*-CLA-

gefütterten laktierenden Kühen eine drastische Milchfettdepression als Folge einer gehemmten Lipogenese beobachtet (Baumgard *et al.* 2002, Peterson *et al.* 2003).

Die signifikante Reduktion der PUFA-Fraktion in den Lipiden der Lebern infolge der CLA-Mix-Diät (Tab. 13) scheint nicht nur aus einer Verschiebung der prozentualen Anteile der Fettsäurenfraktionen zu resultieren. Die Arbeitsgruppe um Eder zeigte, dass sich in HepG2 in Gegenwart von *t*10,*c*12-CLA das Verhältnis der Substrate von verschiedenen Desaturasen zu deren Produkten erhöht, was auf eine aktive Suppression der Desaturation hindeutet (Eder *et al.* 2002, Slomma *et al.* 2004). Angesichts des hohen Ölsäureanteils (Tab. 13, Kelley *et al.* 2004) bei gleichzeitig signifikant verminderter Konzentration der C18:0 (Tab. 13) kann der These einer *t*10,*c*12-CLA-vermittelten Hemmung der hepatischen SCD (Lee *et al.* 1998, Choi *et al.* 2001, Eder *et al.* 2002) jedoch nicht gefolgt werden (Kang *et al.* 2004). Da der SCD-Index im abdominalen Fettgewebe im Gegensatz zur Leber signifikant sank (Tab. 12, Choi *et al.* 2000) und nach *t*10,*c*12-reicher Diät ein signifikanter Anstieg der AA im Adominalfettgewebe beobachtet wurde (Tab. 12, Abb. A2, Zabala *et al.* 2006b), ist eher eine gewebespezifische Regulation der involvierten Desaturasen wahrscheinlich (Viswanadha *et al.* 2006). Allerdings wurde deren Expression in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.

Im Gegensatz zur *c*9,*t*11-CLA-reichen Diät wurden in den Geweben, v.a. der Leber, der CLA-Mix-Gruppe CLA-Isomeren detektiert, die nicht aus der Diät stammten, z.B. die 9,11-Isomeren in *c,c*- und *t,t*-Stellung (vgl. Tab. A3 und A4).

Obwohl die Absorptionsrate von *c*9,*t*11- und *t*10,*c*12-CLA gleich zu sein scheint (Tsuzuki & Ikeda 2007), reichert sich *t*10,*c*12-CLA weniger schnell bzw. in geringerer Konzentration in den Geweben an als *c*9,*t*11-CLA (Zabala *et al.* 2006b). Möglicherweise unterliegt *t*10,*c*12-CLA gewebespezifischen Isomerisierungsprozessen, bei denen sie v.a. in die physiologischen 9,11-Isomeren konvertiert wird. Dieser Mechanismus ist in intestinalen Bakterien gezeigt worden (Coakley *et al.* 2006). Denkbar ist ebenfalls, dass *t*10,*c*12-CLA schnell elongiert und zu konjugierten Tri- oder Tetraenen desaturiert wird oder peroxisomal bzw. mitochondrial β -oxidiert wird (Sébédio *et al.* 1999, Banni *et al.* 2004, Müller *et al.* 2005). *T*10,*c*12-CLA scheint dabei größere β -oxidative Kapazität als *c*9,*t*11-CLA zu besitzen (Müller *et al.* 2005), da anders als für *c*9,*t*11-CLA keine Epimerisierung via Δ^3 -*cis*- Δ^2 -*trans*-Enoyl-CoA-Isomerase (EC 5.3.3.8) nötig ist (Demizieux *et al.* 2002). Die Elongation und Desaturation zu C20:4-Derivaten könnte darüber hinaus zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten führen. Nach oraler Supplementation von *t*10,*c*12-CLA steigt die

renale Exkretion von stabilen Produkten der enzymatischen und nichtenzymatischen Lipidperoxidation signifikant an (Smedman *et al.* 2004).

In Humanstudien wurden CLA-Supplemente eingesetzt, die das *t10,c12*-Isomere – extrapoliert auf die Körpermasse – in 10-40-fach geringerer Menge zuführten als in den o.g. Tierstudien. Entsprechend gab es für eine nachhaltige Reduktion des Körpergewichtes keine ernstzunehmenden Hinweise, während die Datenlage zur Reduktion des abdominalen und Unterhautfettgewebes uneinheitlich ist (Berven *et al.* 2000, Zambell *et al.* 2000, Mougios *et al.* 2001, Kamphius *et al.* 2003, Kelley *et al.* 2003, Whigham *et al.* 2004, Larsen *et al.* 2006, Plourde *et al.* 2008). Obwohl in all diesen Studien keine Veränderung der Leberfunktion nachgewiesen werden konnte, wurde jüngst ein erster Fall von akuter Hepatotoxizität nach Einnahme von CLA mit dem Ziel der Körperfettreduktion bekannt (Ramos *et al.* 2008).

5.4 Methodische Kritik

5.4.1 Co-Kultur

Das Protokoll zur Co-Kultur von BEAS-2B und humanen Eosinophilen einschließlich der eingesetzten Konzentrationen von TNF- α und IL-5 wurde von Takafuji *et al.* (1996) adaptiert und lediglich hinsichtlich der Inkubationsdauer leicht modifiziert. Die Autoren beschrieben, dass es für eine signifikante Induktion der ECP-Produktion sowohl der Aktivierung der Epithelzellen als auch der Eosinophilen bedarf. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen, dass es bei kombinierter Stimulation etwa zur Verdopplung der ECP-Konzentration im Überstand der Co-Kultur kommt (Abb. 20).

In Reaktion auf TNF- α exprimieren Atemwegsepithelzellen ICAM-1 und Eosinophile das passende Antigen LFA-1 (Wong *et al.* 2006). Durch die Adhäsionswechselwirkung mit aktivierten Epithelzellen erhalten die Eosinophilen den Stimulus zur Sezernierung ihrer zytotoxischen Proteine (Olszewska-Pazdrak *et al.* 1998). Die Interaktion mit ICAM-1 ist somit nicht nur bedeutend für die Diapedese im »homing«-Prozess (\uparrow 1.1.4.2), sondern auch ein Initiator der Desquamation des Atemwegsepithels, d.h. des Verlustes der strukturellen Integrität. Es gibt Hinweise, dass *c9,t11*-CLA die epitheliale Expression von ICAM-1 hemmt (Chen *et al.* 2004). Allerdings handelte es sich hier um maligne Zellen und bspw. für Endothelzellen konnten keine Effekte gezeigt werden (Schleser *et al.* 2006). Zur Wirkung von *c9,t11*-CLA auf die Expression von ICAM-1 in BEAS-2B gibt es bisher keine Daten. *C9,t11*-CLA wird zeitabhängig in die Zellmembran der BEAS-2B eingebaut (\uparrow 9.4).

Möglicherweise könnte durch frühere CLA-Intervention in den BEAS-2B, also noch vor Zugabe der Eosinophilen zur Co-Kultur, der tendenzielle Hemmeffekt auf die ECP-Produktion verstärkt werden. Da die eosinophile Adhäsion an ICAM-1 durch PPAR γ -Agonisten gehemmt wird (Hirasawa *et al.* 2008), könnte eine Präinkubation der Eosinophilen mit *c9,t11*-CLA ebenfalls zum Hemmeffekt auf die ECP-Sezernierung beitragen. Ein weiterer limitierender Aspekt der Co-Kultur ist die relativ hohe Schwankungsbreite innerhalb der Wiederholungen. Ein Faktor hierfür könnte die inter-individuelle Variabilität sein, da die Eosinophilen von verschiedenen Spendern stammten.

5.4.2 Gaschromatographische Trennung der Fettsäuren einschließlich der CLA

Die einfache GC-FID-Analyse erlaubt keine saubere Trennung der CLA-Isomeren, da die Hauptisomeren coeluiierende Minorisomeren maskieren. Dies betrifft die Peaks für *t7,c9*- und *t8,c10*-CLA, die von *c9,t11*-CLA überlagert sein können (Kramer *et al.* 2004). Daher ist zur adäquaten Separation und Charakterisierung der CLA-Isomeren (bzw. deren FSME) eine zusätzliche Ag⁺-HPLC-Analyse sinnvoll (Sehat *et al.* 1999, Delmonte *et al.* 2004; ↑ 9.5).

5.4.3 Olivenöl als Kontrollöl

Die Verabreichung der olivenölsupplementierten Diät über die Sensibilisierungsphase im Ansatz Sekundäre Prävention hatte keinen Einfluss auf den Th2-assoziierten Sensibilisierungserfolg (vgl. Kontrollen Abb. 22 IA-C mit IIA-C). Verglichen mit dem Ansatz Primäre Prävention war die Konzentration des Th1-assoziierten IgG2a hingegen in beiden Diätgruppen um den Faktor 10 reduziert (vgl. Abb. 22 ID mit IID).

In verschiedenen immunologischen CLA-Studien wurde Olivenöl oder ölsäurereiches Öl als Kontrollöl eingesetzt (Butz *et al.* 2006, Tholstrup *et al.* 2008, Turpeinen *et al.* 2008). Der »Vorteil« dieses Öls liegt darin, dass es kaum eicosanoidpräkursorische PUFA enthält (↑ 9.6), was sich nach 39-tägiger Fütterung einer olivenölreichen Diät im Fettsäurenspektrum von Abdominalfett, Leber und Erythrozyten widerspiegelte (↑ 9.6). Entsprechend lassen sich die großen Unterschiede in der Gewebekonzentration der n6- und n3-PUFA zwischen den Ansätzen erklären (vgl. Abb. 29 IB mit IIB und IC mit IIC). Obwohl die C18:1c9, die ca. 76 % der Gesamtfettsäuren im Olivenöl ausmacht (↑ 9.6), ein schwacher PPAR γ -Aktivator ist (Xu *et al.* 1999) scheint sie, anders als *c9,t11*-CLA, keinen regulatorischen Einfluss auf PPAR γ auszuüben (vgl. Abb. 27 I mit II; Coll *et al.* 2006). Bislang gibt es keine Untersuchungen darüber, wie sich eine olivenölreiche Diät auf die Th1-assoziierte

Immunglobulinproduktion auswirkt. Allerdings ist das antiinflammatorische Potential von Olivenöl schon länger bekannt. Kaltgepresstes Olivenöl ist reich an phenolischen Substanzen wie Oleocanthal (Andrewes *et al.* 2003), dessen beide Enantiomere ähnliche entzündungshemmende Eigenschaften wie das Analgetikum Ibuprofen aufweisen (Beauchamp *et al.* 2005). Yamada *et al.* (2008) vermuteten, dass Olivenöle mit hohem Flavonoidgehalt aufgrund ihrer inhibitorischen Effekte auf die sekretorische Funktion von Granulozyten antiallergisch wirksam sein könnten. Andere MPC (minor polar compounds) der Secoiridoidfamilie im Olivenöl sind das Hydroxytyrosol und Oleuropein-Aglykon, die in Makrophagen die NF κ B- und STAT1-abhängige Expression der iNOS und COX-2 hemmen (Maiuri *et al.* 2005), ohne dabei PPAR γ regulatorisch zu beeinflussen (Brunelleschi *et al.* 2007).

5.5 Andere immunmodulatorische Milchinhaltsstoffe

In den letzten Jahren wird die Rolle der intestinalen Mikroflora bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen verstärkt diskutiert. Dabei steht der Aspekt des Stillens von Neugeborenen im Fokus, da die Milchfütterung eine bifidusdominierte Kolonisation des Darms fördert (Fanaro *et al.* 2003, Newburg & Walker 2007). Erkenntnisse aus vergleichenden Studien weisen darauf hin, dass ein Ungleichgewicht in der bakteriellen Besiedlung des Darms zugunsten von Clostridien mit einem erhöhten Allergierisiko verbunden ist (Sepp *et al.* 1997, Linneberg *et al.* 2003, Penders *et al.* 2007), und dass die Supplementation mit milchsäurebildenden probiotischen Bakterien im Kleinkindalter vor allergischen Manifestationen schützen kann (rev. in Betsi *et al.* 2008). Im *in vivo*-Asthma-modell wirken oral verabreichte Probiotika über die Induktion einer T_{reg}-Antwort primärpräventiv auf die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung (Feleszko *et al.* 2007). In einem ähnlichen Modell konnte selbst bei maternaler Supplementation während der perinatalen Phase dieser Effekt erzielt werden (Blümer *et al.* 2007). Bifidobakterium und Laktobazillus *ssp.* produzieren kurzkettige organische Carbonsäuren wie Essig-, Propion- und Milchsäure, welche das Wachstum von Clostridien und anderen koliformen Keimen hemmen. Gleichzeitig wirken komplexe Oligosaccharide bifidogen, indem sie der enzymatischen Aufspaltung im Verdauungstrakt entgehen, von der probiotischen Flora fermentiert werden und deren Wachstum fördern (Knol *et al.* 2005). Oral verabreicht beeinflussen präbiotische Oligosaccharide das Immunglobulinprofil in Kleinkindern mit hohem Risiko für allergische Erkrankungen positiv (van Hoffen *et al.* 2008). Allerdings ist ihr Gehalt in der bovinen Milch sehr viel geringer als in der humanen Milch und nur im

Kolostrum bedeutend (Gopal & Gill 2000). Neben immunologisch wirksamen Prä- und Probiotika beinhaltet Milch bioaktive Komponenten aus der Substanzklasse der Proteine. Verschiedenen kasein- und molkenproteinassoziierten Peptiden wurde eine immunmodulatorische Wirkung nachgewiesen (rev. in Cross & Gill 2000 und Shah 2000). Für κ -Kasein wurde in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad ein hemmender Effekt auf die Splenozytenproliferation gezeigt (Otani *et al.* 1995a). Auch gibt es einige Hinweise für einen suppressiven Effekt von Kaseinglykopeptiden und Laktoferrin auf die Immunglobulinproduktion und lokale Reaktion im Rahmen der allergischen (Typ-I-)Hypersensitivität (Otani & Yamada 1995b, Wong *et al.* 1996, Monnai *et al.* 1998). Auf der anderen Seite besitzen Kasein- wie auch α -Laktalbumin- und β -Laktoglobulinpeptide allergenes Potential und sind prädiktive Faktoren für die Persistenz von atopischen Erkrankungen (Volkerstorfer *et al.* 2002). Neben Laktoferrin sind die bovinen Immunglobuline (hauptsächlich IgG1), das Lysozym und die Laktoperoxidase wegen ihrer bakteriostatischen und bakterioziden Effekte bei Infektionen immunologisch sehr wirksam (rev. in Shah 2000), allerdings sind sie ebenfalls nur in der kolostralen Milch von Bedeutung und spielen bei der Allergieprävention eher keine Rolle. Andere immunmodulatorische Inhaltsstoffe der Wiederkäuermilch sind das sCD14, das die zellvermittelte Immunität stimuliert (Lee *et al.* 2003), und immunsuppressiv wirkende TGF- β -Analoga (Stoeck *et al.* 1989). Im Menschen korrelieren ihre Serumkonzentrationen mit dem IgA, was wiederum invers mit dem Allergierisiko verbunden ist (Savilahti *et al.* 2005). Dass der häufige Konsum von Milch, die von Bauernhöfen bezogen wurde, einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von allergischem Asthma ausübt (Riedler *et al.* 2001, Woods *et al.* 2003, Waser *et al.* 2007) könnte u.a. durch ihren natürlichen Gehalt an mikrobiellen Substanzen erklärt werden (von Mutius & Radon 2008). Dies wird einerseits dadurch unterstützt, dass das kindliche Immunsystem bereits durch pränatale Endotoxinexposition nachhaltig geprägt und auf eine nicht-allergische Immunitätslage »vorbereitet« wird (Ege *et al.* 2006; ↑ 1.1.5.3), und andererseits durch die Beobachtung, dass dieser Effekt durch regelmäßigen Konsum von Milch anhält und verstärkt wird (Bieli *et al.* 2007). Darüber hinaus scheint der Fettgehalt ein entscheidender Faktor für die präventive Wirksamkeit der Milch zu sein, da nur Vollfettmilch mit einem reduzierten Allergierisiko assoziiert werden konnte (Wijga *et al.* 2003, Woods *et al.* 2003). Dies untermauert die in dieser Arbeit formulierte Hypothese, dass *c9,t11*-CLA zum schützenden Effekt von Milch auf die Entstehung von allergischem Asthma beiträgt.

5.6 Ausblick auf Anwendbarkeit

Bei der Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf eine mögliche therapieunterstützende Anwendbarkeit von *c9,t11*-CLA als Nahrungssupplement beim Menschen sollte trotz allem Zurückhaltung geboten sein. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von *c9,t11*-CLA in der Diät entsprach dem der Literatur entnommenen Wert von 1 % der Diät (w/w). Um Effekte in gleicher Größenordnung zu erzielen, müsste ein Mensch etwa 1 g CLA/kg Körpergewicht zu sich nehmen. Dies wäre allenfalls durch Hochdosis-Supplementation möglich, wobei es sich nach heutiger Datenlage um Supplemente handeln sollte, die die natürlicherweise vorkommenden CLA-Isomeren enthalten. Eine primärpräventive bzw. prophylaktische Nahrungssupplementation mit *c9,t11*-CLA wäre bspw. bei Kindern mit hohem Risiko für allergische Erkrankungen denkbar und interessant, wohl aber von geringer Praxisrelevanz. Da der *c9,t11*-CLA-vermittelte Hemmeffekt nicht nur die allergische Sensibilisierung sondern auch die Ausbildung einer Atemwegsentzündung betraf, könnte der Einsatz von CLA bei Patienten mit bestehender Allergie von Nutzen sein. Dennoch gibt es speziesspezifische Unterschiede in der Affinität der PPAR-Liganden, was eventuell dazu führt, dass sich die im Tiermodell beobachteten Effekte im Menschen nicht reproduzieren lassen (Keller *et al.* 1997). Aus diesen Gründen müssen weiterführende Studien, bei denen auch die humanen Rezeptorvarianten untersucht werden, zeigen, welche Rolle *c9,t11*-CLA als therapieunterstützendes Nahrungssupplement bei der Behandlung von manifestem allergischen Bronchialasthma spielen könnte. Erste Untersuchungen an allergischen Patienten sind sehr vielversprechend (Turpeinen *et al.* 2008).

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob *c9,t11*-CLA als natürlicherweise in Milch vorkommende Fettsäure über eine entzündungshemmende Wirkung via PPAR γ zum präventiven Effekt von (Voll-)Milch auf die Entstehung von allergischem Asthma bronchiale beiträgt. Hierzu wurden zunächst *in vitro* die Effekte einer Intervention mit *c9,t11*-CLA auf asthmaassoziierte entzündliche Prozesse in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Eosinophilen von allergischen Spendern evaluiert. Im Gegensatz zu Linolsäure hemmte die Präinkubation mit 10 μ g *c9,t11*-CLA/ml die stimulusinduzierte Produktion von IL-8 auf Protein- und mRNA-Ebene in BEAS-2B (Tab. Zusammenfassung). In diese Hemmung war der Rezeptor PPAR γ involviert, da der Effekt durch Coadministration von GW9662 (selektiver PPAR γ -Inhibitor) vollständig aufgehoben wurde. In den Eosinophilen reduzierte *c9,t11*-CLA signifikant die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD13, ohne die Vitalität der Zellen zu beeinflussen. In einer Co-Kultur von BEAS-2B und Eos wurde in Gegenwart von *c9,t11*-CLA eine tendenzielle Reduktion der ECP-Produktion beobachtet. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde in einem Mausmodell (BALB/c) geprüft, ob die Gabe einer *c9,t11*-CLA-reichen Diät die Ausbildung einer allergischen Atemwegshyperreaktivität und -entzündung inhibiert. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt: a. Primäre Prävention (Hemmung einer allergischen Sensibilisierung) und b. Sekundäre Prävention (Immunmodulation nach einer allergischen Sensibilisierung). Auch in diesen Studien sollte geklärt werden, ob die Effekte von *c9,t11*-CLA durch PPAR γ -Aktivierung vermittelt werden. Die Gabe einer *c9,t11*-CLA-reichen Diät (1 % w/w) 7 Tage vor und für 32 Tage während des Immunisierungszeitraums zeigte sowohl auf eine allergische Sensibilisierung als auch eine unspezifische Atemwegshyperreaktivität einen signifikanten Hemmeffekt (Ansatz a. Primäre Prävention). Gleichzeitig waren die typischen Merkmale einer Th2-getriebenen asthmatischen Reaktion wie IL-5-assoziierte Eosinophilie und Mukushypersekretion reduziert. Da die *c9,t11*-CLA-reiche Diät die Downregulation der pulmonalen PPAR γ -mRNA verhinderte und der Hemmeffekt durch Coadministration von GW9662 vor und während der Atemwegschallenges größtenteils aufgehoben wurde, erscheint eine PPAR γ -vermittelte Wirkungsweise der CLA plausibel. Die *c9,t11*-CLA-reiche Diät resultierte darüber hinaus in einer signifikanten Reduktion des Anteils an n6-PUFA in den Geweben/Organen (Abdominalfett, Leber, Erythrozyten, Milz). Gleichzeitig zeichnete sich eine Tendenz für die Inhibition der allergenspezifischen Splenozytenproliferation ab, was auf einen systemischen Effekt von *c9,t11*-CLA auf die

Immunantwort hindeutet.

Tabelle Zusammenfassung: Effekte von *c9,t11*-CLA (10 µg/ml *in vitro* bzw. 1 % der Diät, w/w, *in vivo*) auf immunologische Parameter.

Modell	Parameter	% Reduktion vs. Kontrolle (Stimulation)	Signifikanz
<i>In vitro</i>	BEAS-2B	IL-8 Protein	34 ± 6 (LPS + Serum) *
		IL-8-mRNA	37 ± 5 (LPS + Serum) *
	Eos	Vitalität	↔
		CD69 SMF	29 ± 11 (IL-5) *
			38 ± 7 (IL-5 + TNF-α) *
		CD13 SMF	26 ± 5 (IL-5) *
			18 ± 7 (IL-5 + TNF-α) *
	Co-Kultur	ECP Protein	24 ± 9 (TNF-α) p = 0,068
			25 ± 10 (IL-5) p = 0,068
			18 ± 5 (IL-5 + TNF-α) p = 0,1
<i>In vivo</i>	Primäre Prävention	Gesamt-IgE	33 ± 5 *
		OVA-IgE	42 ± 14 p > 0,1
		OVA-IgG1	31 ± 9 *
		OVA-IgG2a	75 ± 7 *
		AR	
		P _{enh}	43 ± 13 (Mch 50) * ¹
		Eosinophilie	61 ± 5 *
		IL-5 in BAL	50 ± 10 *
		PAS-Score	62 ± 9 n.b.
		SI Splenozyten	46 ± 12 p = 0,07
		n6-PUFA	
		Abdom. Fettgewebe	48 ± 2 ***
		Leber	37 ± 4 ***
		Erythrozyten	26 ± 3 **
	Sekundäre Prävention	Gesamt-IgE	24 ± 5 p = 0,123
		OVA-IgE	40 ± 14 p = 0,1
		OVA-IgG1	↔
		OVA-IgG2a	↔
		AR	
		P _{enh}	59 ± 9 (Mch 50) p = 0,1 ¹
		Eosinophilie	34 ± 14 p = 0,08
		IL-5 in BAL	50 ± 7 *
		PAS-Score	28 ± 15 n.b.
		n6-PUFA	
		Abdom. Fettgewebe	35 ± 3 ***
		Leber	50 ± 6 **
		Erythrozyten	↔

AR · Atemwegsreaktivität, BAL · Bronchoalveoläre Lavage, ECP · Eosinophiles Kationisches Protein, Mch 50 · 50 mg Metacholin/ml, n.b. · nicht bestimmt, PAS · Periodic Acid Schiff, P_{enh} · Enhanced Pause, SI · Stimulationsindex, ↔ · kein Unterschied, ¹ · ANOVA für Messwiederholungen, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001

Die Akkumulation der CLA erfolgte in einem dem supplementierten Öl entsprechenden Verhältnis. Im Gegensatz zu einer Diät, die mit einem CLA-Mix-Präparat angereichert wurde (*c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA 1 % w/w), waren nach 39-tägiger Fütterung der *c9,t11*-CLA-reichen Diät weder für Lipodystrophie phänotypische Veränderungen noch unphysiologisch starke Veränderungen in der Fettsäurenverteilung in den Organen festzustellen.

Wurde die *c9,t11*-CLA-reiche Diät nach der Sensibilisierung verabreicht (16 Tage über den Zeitraum der konsekutiven Atemwegs challenges an den Tagen 28-30, Ansatz b. Sekundäre Prävention), konnte eine tendenzielle Reduktion des spezifischen IgE und der Zahl Eosinophiler in der bronchoalveolären Lavage festgestellt werden. Für die pulmonale IL-5-Produktion war die *c9,t11*-CLA-vermittelte Hemmung signifikant. Der $PC_{200P_{enh}}$, ein Parameter, der mit der Empfindlichkeit der Atemwege negativ korreliert, stieg infolge *c9,t11*-CLA-reicher Diät signifikant an. Da die 16-tägige Fütterungsdauer in bereits sensibilisierten Tieren die Downregulation von $PPAR\gamma$ in der Lunge nicht verhindern konnte, der n6-PUFA-Anteil in den Lipiden der analysierten Organe/Gewebe (mit Ausnahme der Erythrozyten) aber signifikant vermindert war, ist ein dualer Mechanismus der *c9,t11*-CLA-vermittelten Entzündungshemmung wahrscheinlich.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass *c9,t11*-CLA über einen dualen Mechanismus der Entzündungshemmung (via $PPAR\gamma$ -vermittelte Hemmung der Th2-assoziierten Immunantwort und Reduktion der n6-PUFA in den Körpergeweben) zum schützenden Effekt von (Voll-)milch auf die Entstehung von allergischem Asthma beiträgt. Die Akkumulation der supplementierten CLA erfolgte dem physiologischen Lipidmetabolismus entsprechend und ohne unphysiologisch starke Auswirkung auf die Fettsäurespektren der Körpergewebe bzw. phänotypische Auffälligkeit. Zukünftig könnte die Supplementation mit *c9,t11*-CLA als therapieunterstützende Maßnahme eine attraktive Strategie in der Behandlung von allergischem Bronchialasthma darstellen.

7 Summary

Milk consumption from early childhood on has been found to be inversely correlated with allergic sensitization and the onset of bronchial asthma. Ruminant full cream milk and butter are the main source of *c9,t11*-CLA, that is suggested to exert an anti-inflammatory action via a PPAR γ -related mechanism. The purpose of this thesis was to elucidate at first *in vitro* whether *c9,t11*-CLA (10 μ g/mL) modulates eosinophilic and epithelial functions with direct consequences for development of airway disease. Further aim was to test whether dietary supplementation with a *c9,t11*-CLA-rich triacylglycerol (1 % *c9,t11*-CLA by weight of diet) systemically affects allergic sensitization and may therefore inhibit or reduce allergic airway inflammation in a murine model of asthma. In BEAS-2B, the addition of *c9,t11*-CLA significantly reduced the production of stimulated IL-8 at mRNA and protein levels. This reduction was mediated by PPAR γ , since receptor blocking with the selective antagonist GW9662 restored the inhibitory effect of *c9,t11*-CLA. Further, the eosinophilic expression of the activation markers CD69 and CD13 was significantly reduced, whereas ECP release measured in co-culture supernatant tended to decrease in the presence of *c9,t11*-CLA. In a primary prevention model in which naïve BALB/c mice were fed with the *c9,t11*-CLA- or a control diet 7 d prior to and for 32 d during allergen sensitization and airway challenge, *c9,t11*-CLA feeding resulted in significantly reduced IgE production and allergen-induced *in vivo* airway hyperresponsiveness. Further, less mucous plugging of segmental bronchi and significantly reduced IL-5-associated eosinophils were determined in bronchoalveolar lavage fluids of *c9,t11*-CLA fed mice. The inhibitory effects of *c9,t11*-CLA on airway inflammation were abrogated or tended to revert by coadministration of GW9662, suggesting a receptor-mediated mode of action. Development of airway inflammation in immunized control mice was positively associated with a dramatic decrease in PPAR γ mRNA in lung tissues. In contrast, *c9,t11*-CLA feeding prevented the downregulation of PPAR γ , indicating an inverse and causal relationship between PPAR γ and the induction of allergic airway inflammation. This was further sustained by the observation that GW9662 treatment partly reconstituted the asthmatic phenotype and almost abolished PPAR γ mRNA in the lungs. Since the accumulation of *c9,t11*-CLA in adipose, liver, erythrocytes, lung, and spleen according to physiological lipid metabolism resulted in a significant reduction of the eicosanoid precursory n6-PUFA, like arachidonic acid, in these tissues, and a tendency towards a reduction in allergen-specific splenocyte proliferation emerged, a systemic effect of *c9,t11*-CLA on immune functions is conceivable. In comparison to a diet enriched with a CLA-mix preparation, the *c9,t11*-CLA diet did not cause lipodystrophic alterations after 39 d.

In a secondary prevention model in which feeding of the *c9,t11*-CLA-enriched or control diet started after the systemic sensitization period on d 16 and lasted until d 32, the IL-5 concentration in bronchoalveolar lavage fluid was significantly diminished whereas the IL-5-associated eosinophilia tended to decrease in the *c9,t11*-CLA fed group. Even the specific IgE was reduced by trend after *c9,t11*-CLA feeding. Moreover, PC₂₀₀P_{enh}, a parameter that negatively correlates with airway hyperresponsiveness, was significantly increased following *c9,t11*-CLA diet. As in the primary prevention model, the concentration of n6-PUFA was significantly reduced in adipose and liver tissue.

In conclusion, the data of the present work show a specific inhibitory function of *c9,t11*-CLA on allergen-induced airway inflammation by a dual mechanism through PPAR γ -mediated inhibition of a Th2-related immune response and reduction of eicosanoid-precursory n6-PUFA. This inhibition affected both allergic sensitization and the development of allergic airway disease. Moreover, these data suggest that this fatty acid, naturally occurring in dairy products, may contribute to the protective effect of milk with respect to childhood asthma. Aiming at improving the disease-related life quality of asthmatic patients, a nutritional supplementation with *c9,t11*-CLA might be of clinical relevance.

8 Literaturverzeichnis

- ABUGHAZALEH AA**, Holmes LD. Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 90: 2897-904, 2007
- AFIF H**, Benderdour M, Mfuna-Endam L, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Fahmi H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is downregulated by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 9: R31, 2007
- ALAM R**, York J, Boyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1398-404, 1996
- ALI FY**, Egan K, FitzGerald GA, Desvergne B, Wahli W, Bishop-Bailey D, Warner TD, Mitchell JA. Role of prostacyclin versus peroxisome proliferator-activated receptor beta receptors in prostacyclin sensing by lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 242-6, 2006
- ALONSO L**, Cuesta EP, Gilliland SE. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J Dairy Sci* 86: 1941-6, 2003
- ALPHONSE MP**, Saffar AS, Shan L, HayGlass KT, Simons FE, Gounni AS. Regulation of the high affinity IgE receptor (Fc epsilonRI) in human neutrophils: role of seasonal allergen exposure and Th-2 cytokines. *PLoS ONE* 3: e1921, 2008
- AMSEN D**, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117: 515-26, 2004
- ANDREWES P**, Busch J, De Joode T, Groenewegen A, Alexandre H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J Agric Food Chem* 51: 1415-20, 2003
- AOKI H**, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Kawata T, Shimizu Y, Okajima F, Dobashi K, Mori M. Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 509-15, 2008
- ARE A**, Aronsson L, Wang S, Greicius G, Lee YK, Gustafsson JA, Pettersson S, Arulampalam V. *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPARgamma activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1943-8, 2008
- ARIEL A**, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* 28: 176-83, 2007
- ARSENIJEVIC D**, de Bilbao F, Plamondon J, Paradis E, Vallet P, Richard D, Langhans W, Giannakopoulos P. Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor beta-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 433-45, 2006
- ASQUITH KL**, Ramshaw HS, Hansbro PM, Beagley KW, Lopez AF, Foster PS. The IL-3/IL-5/GM-CSF common receptor plays a pivotal role in the regulation of Th2 immunity and allergic airway inflammation. *J Immunol* 180: 1199-206, 2008
- BAGGA D**, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1751-6, 2003
- BALCERZYK A**, Zak I, Krauze J. Synergistic effect between polymorphisms of PPARA and ABCA1 genes on the premature coronary artery disease. *Acta Cardiol* 62: 233-8, 2007

- BALL TM**, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 343: 538-43, 2000
- BANNI S**, Petroni A, Blasevich M, Carta G, Angioni E, Murru E, Day BW, Melis MP, Spada S, Ip C. Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. *Biochim Biophys Acta* 1682: 120-7, 2004
- BASSAGANYA-RIERA J**, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Henninghausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 127: 777-91, 2004
- BASSAGANYA-RIERA J**, Hontecillas R. CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. *Clin Nutr* 25: 454-65, 2006
- BAUMGARD LH**, Matitashvili E, Corl BA, Dwyer DA, Bauman DE. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis. *J Dairy Sci* 85: 2155-63, 2002
- BEAUCHAMP GK**, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437: 45-6, 2005
- BECKER J**, Delayre-Orthez C, Frossard N, Pons F. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol* 20: 429-47, 2006
- BECKER J**, Delayre-Orthez C, Frossard N, Pons F. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression during lung inflammation. *Pulm Pharmacol Ther* 21: 324-30, 2008
- BELLINGHAUSEN I**, Brand U, Steinbrink K, Enk AH, Knop J, Saloga J. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 108: 242-9, 2001
- BELLINGHAUSEN I**, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J. Inhibition of human allergic T-helper type 2 immune responses by induced regulatory T cells requires the combination of interleukin-10-treated dendritic cells and transforming growth factor-beta for their induction. *Clin Exp Allergy* 36: 1546-55, 2006
- BELURY MA**, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Nutr Res* 22: 817-24, 2002
- BELVISI MG**, Hele DJ. Peroxisome proliferator-activated receptors as novel targets in lung disease. *Chest* 134: 152-7, 2008
- BEPPU F**, Hosokawa M, Tanaka L, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 17: 830-6, 2006
- BERDEAUX O**, Christie WW, Gunstone FD, Sébédio JL. Large-scale synthesis of methyl *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoate from methyl ricinoleate. *JAACS* 74: 1011-5, 1997
- BERDEAUX O**, Voinot L, Angioni E, Juanéda P, Sébédio JL. A simple method of preparation of methyl *trans*-10,*cis*-12- and *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoate from methyl linoleate. *JAACS* 75: 1749-55, 1998
- BERGAMO P**, Maurano F, D'Arienzo R, David C, Rossi M. Association between activation of phase 2 enzymes and down-regulation of dendritic cell maturation by c9,t11-conjugated linoleic acid. *Immunol Lett* 117: 181-90, 2008

- BERVEN G**, Bye A, Hals O, Blankson H, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight and obese human volunteers. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 455-62, 2000
- BETSI GI**, Papadavid E, Falagas ME. Probiotics for the treatment or prevention of atopic dermatitis: a review of the evidence from randomized controlled trials. *Am J Clin Dermatol* 9: 93-103, 2008
- BHARATHAN M**, Schingoethe DJ, Hippen AR, Kalscheur KF, Gibson ML, Karges K. Conjugated linoleic acid increases in milk from cows fed condensed corn distillers solubles and fish oil. *J Dairy Sci* 91: 2796-807, 2008
- BIELI C**, Eder W, Frei R, Braun-Fahrlander C, Klimecki W, Waser M, Riedler J, von Mutius E, Scheynius A, Pershagen G, Doekes G, Lauener R, Martinez FD; PARSIFAL study group. A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression. *J Allergy Clin Immunol* 120: 1308-15, 2007
- BLACK PN**, Sharpe S: Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Resp J* 10: 6-12, 1997
- BLACK PN**. The prevalence of allergic disease and linoleic acid in the diet. *J Allergy Clin Immunol* 103: 351-52, 1999
- BLANQUART C**, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferators-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 267-73, 2003
- BLIGH EG**, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1959
- BLÜMER N**, Sel S, Virna S, Patrascu CC, Zimmermann S, Herz U, Renz H, Garn H. Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus GG* suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin Exp Allergy* 37: 348-57, 2007
- BOLTE G**, Frye C, Hoelscher B, Meyer I, Wjst M, Heinrich J. Margarine consumption and allergy in children. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 277-9, 2001
- BOLTE G**, Winkler G, Hölscher B, Thefeld W, Weiland SK, Heinrich J. Margarine consumption, asthma, and allergy in young adults: results of the German National Health Survey 1998. *Ann Epidemiol* 15: 207-13, 2005
- BOOTH BW**, Sandifer T, Martin EL, Martin LD. IL-13-induced proliferation of airway epithelial cells: mediation by intracellular growth factor mobilization and ADAM17. *Respir Res* 8: 51, 2007
- BORCHERT M**, Schöndorf T, Lübken G, Forst T, Pfützner A. Review of the pleiotropic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on platelet function. *Diabetes Technol Ther* 9: 410-20, 2007
- BORNEHAG CG**, Sundell J, Weschler CJ, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hägerhed-Engman L. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 112: 1393-7, 2004
- BOUATTOR MA**, Casals R, Albanell E, Such X, Caja G. Feeding soybean oil to dairy goats increases conjugated linoleic acid in milk. *J Dairy Sci* 91: 2399-407, 2008
- BRADDING P**, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1277-84, 2006
- BRAUN RK**, Foerster M, Workalemahu G, Haefner D, Kroegel C, Walker C. Differential regulation of aminopeptidase N (CD13) by transendothelial migration and cytokines on human eosinophils. *Exp Lung Res* 29: 59-77, 2003
- BROWN JM**, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh MK. Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. *J Lipid Res* 44: 1278-300, 2003

- BRUNELLESCHI S**, Bardelli C, Amoruso A, Gunella G, Ieri F, Romani A, Malorni W, Franconi F. Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF-kappa B translocation in human monocyte/macrophages. *Pharmacol Res* 56: 542-9, 2007
- BU DP**, Wang JQ, Dhiman TR, Liu SJ. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci* 90: 998-1007, 2007
- BULGARELLA JA**, Patton D, Bull AW. Modulation of prostaglandin H synthase activity by conjugated linoleic acid (CLA) and specific CLA isomers. *Lipids* 36: 407-12, 2001
- BURGESS HA**, Daugherty LE, Thatcher TH, Lakatos HF, Ray DM, Redonnet M, Phipps RP, Sime PJ. PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L1146-53, 2005
- BURTON GW**, Ingold KU, Thompson KE. An improved procedure for the isolation of ghost membranes from human red blood cells. *Lipids* 16: 946, 1981
- BUTZ DE**, Li G, Cook ME. t10,c12 Conjugated linoleic acid induces compensatory growth after immune challenge. *J Nutr Biochem* 17: 735-41, 2006
- CALDER PC**, Yaqoob P, Harvey DJ, Watts A, Newsholme EA. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem J* 300 (Pt 2): 509-18, 1994
- CAPRON M**, Morita M, Woerly G, Lengrand F, Gounni AS, Delaporte E, Capron A. Differentiation of eosinophils from cord blood cell precursors: kinetics of Fc epsilon RI and Fc epsilon RII expression. *Int Arch Allergy and Immunol* 113: 48-50, 1997
- CARLSEN KH**, Lødrup Carlsen KC. Parental smoking and childhood asthma: clinical implications. *Treat Respir Med* 4: 337-46, 2005
- CELEDÓN JC**, Milton DK, Ramsey CD, Litonjua AA, Ryan L, Platts-Mills TA, Gold DR. Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 120: 144-9, 2007
- CELLA M**, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782-7, 1997
- CESANO A**, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-34, 1998
- CHEN BQ**, Yang YM, Wang Q, Gao YH, Liu JR, Zhang JS, Wang XL, Liu RH. Effects of c9,t11-conjugated linoleic acid on adhesion of human gastric carcinoma cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol* 10: 1392-6, 2004
- CHEN CA**, Sih CJ. Chemoenzymatic synthesis of conjugated linoleic acid. *J Org Chem* 63: 9620-1, 1998
- CHEN CA**, Lu W, Sih CJ. Synthesis of 9Z,11E-octadecadienoic and 10E,12Z-octadecadienoic acids, the major components of conjugated linoleic acid. *Lipids* 34: 879-84, 1999
- CHIN SF**, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 5: 185-97, 1992
- CHIN SF**, Storkson JM, Albright KJ, Cook ME, Pariza MW. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J Nutr* 124: 2344-9, 1994
- CHINETTI-GBAGUIDI G**, Fruchart JC, Staels B. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches. *Curr Opin Pharmacol* 5: 177-83, 2005

- CHO HJ**, Kim EJ, Lim SS, Kim MK, Sung MK, Kim JS, Park JH. Trans-10,cis-12, not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 136: 893-8, 2006
- CHO MH**, Kang JH, Yang MP. Immunoenhancing effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on the phagocytic capacity and oxidative burst activity of canine peripheral blood phagocytes. *Res Vet Sci* 85: 269-78, 2008
- CHOI Y**, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 130: 1920-4, 2000
- CHOI Y**, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 689-93, 2001
- CHUANG LT**, Leonard AE, Liu JW, Mukerji P, Bray TM, Huang YS. Inhibitory effect of conjugated linoleic acid on linoleic elongation in transformed yeast with human elongase. *Lipids* 36: 1099-103, 2001
- CHUANG LT**, Thurmond JM, Liu JW, Mukerji P, Bray TM, Huang YS. Effect of conjugated linoleic acid on delta-5 desaturase activity in yeast transformed with fungal delta-5 desaturase gene. *Mol Cell Biochem* 265: 11-8, 2004
- CHUNG S**, Brown JM, Provo JN, Hopkins R, McIntosh MK. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NFkappaB-dependent cytokine production. *J Biol Chem* 280: 38445-56, 2005
- CHUNG SW**, Kang BY, Kim TS. Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association of between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. *Mol Pharmacol* 64: 1169-79, 2003
- CIESLEWICZ G**, Tomkinson A, Adler A, Duez C, Schwarze J, Takeda K, Larson KA, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest* 104: 301-8, 1999
- CLARK R**, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula S. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 164: 1364-71, 2000
- CLÉMENT L**, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guere-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43: 1400-9, 2002
- COAKLEY M**, Ross RP, Nordgren M, Fitzgerald G, Devery R, Stanton C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species. *J Appl Microbiol* 94: 138-45, 2003
- COAKLEY M**, Johnson MC, McGrath E, Rahman S, Ross RP, Fitzgerald GF, Devery R, Stanton C. Intestinal bifidobacteria that produce trans-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a fatty acid with antiproliferative activity against human colon SW480 and HT-29 cancer cells. *Nutr Cancer* 56: 95-102, 2006
- COLL T**, Jové M, Rodriguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sánchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 55: 2779-87, 2006
- COLLOMB M**, Bütikofer U, Sieber R, Jeangros B, Bosset JO. Composition of fatty acids in cow's milk fat in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *Int Dairy J* 12: 649-59, 2002

- COLLOMB M**, Sieber R, Bütikofer U. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids* 39: 355-64, 2004
- CORL BA**, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE. The role of Δ^9 -desaturase in the production of cis-9,trans-11 CLA. *J Nutr Biochem* 12: 622-30, 2001
- CORL BA**, Baumgard LH, Griinari JM, Delmonte P, Morehouse KM, Yurawecz MP, Bauman DE. Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by Δ^9 -desaturase in dairy cows. *Lipids* 37: 681-8, 2002
- CROSBY JR**, Cieslewicz G, Borchers M, Hines E, Carrigan P, Lee JJ, Lee NA. Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG. *J Immunol* 168: 4050-4, 2002
- CROSS ML**, Gill HS. Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr* 84 (Suppl 1): S81-9, 2000
- CUMMINGS RJ**, Parinandi NL, Zaiman A, Wang L, Usatyuk PV, Garcia JGN, Natarajan V. Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 30227-35, 2002
- DE ALVARO C**, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem* 279: 17070-8, 2004
- DEGRACE P**, Demizieux L, Gresti J, Chardigny JM, Sébédio JL, Clouet P. Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridemia in C57BL/6j mice fed trans-10,cis-12-linoleic acid. *FEBS Letters* 546: 335-9, 2003
- DE LA TORRE A**, Debiton E, Durand D, Chardigny JM, Berdeaux O, Loreau O, Barthomeuf C, Bauchart D, Gruffat D. Conjugated linoleic acid isomers and their conjugated derivatives inhibit growth of human cancer cell lines. *Anticancer Res* 25: 3943-9, 2005
- DELERIVE P**, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters J, Gonzalez F, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274: 32048-54, 1999
- DELERIVE P**, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 169: 453-9, 2001
- DELMONTE P**, Yurawecz MP, Mossoba MM, Cruz-Hernandez C, Kramer JKG. Improved identification of conjugated linoleic acid isomers using silver-ion HPLC separations. *J AOAC Int* 87: 563-8, 2004
- DELMONTE P**, Kataoka A, Corl BA, Bauman DE, Yurawecz MP. Relative retention order of all cis/trans conjugated linoleic acid FAME from the 6,8- to 13,15-positions using silver ion HPLC with two elution systems. *Lipids* 40: 509-14, 2005
- DEMIZIEUX L**, Degrace P, Gresti J, Loreau O, Noël JP, Chardigny JM, Sébédio JL, Clouet P. Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation. *J Lipid Res* 43: 2112-22, 2002
- DENNING GM**, Stoll LL. Peroxisome proliferator-activated receptors: potential therapeutic targets in lung disease? *Pediatr Pulmonol* 41: 23-34, 2006
- DESERGNE B**, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-88, 1999
- DEUTSCHE ATEMWEGSLIGA E.V. UND DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR PNEUMOLOGIE** (Hrsg.). Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Asthma. Kurzfassung. Thieme-Verlag 2005. ISBN: 3-13-133861-X
- DEVCHAND PR**, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzales FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43, 1996

- DHIMAN TR**, Anand GR, Satter LD, Pariza MW. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J Dairy Sci* 82: 2146-56, 1999
- DHIMAN TR**, Nam SH, Ure AL. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 463-82, 2005
- DOGANCI A**, Sauer K, Karwot R, Finotto S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol* 28: 257-70, 2005
- DRAGOMIR E**, Tircol M, Manduteanu I, Voinea M, Simionescu M. Aspirin and PPAR-alpha activators inhibit monocyte chemoattractant protein-1 expression induced by high glucose concentration in human endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 44: 440-9, 2006
- DUBIN W**, Martin TR, Swoveland P, Leturcq DJ, Moriarty AM, Tobias PS, Bleecker ER, Goldblum SE, Hasday JD. Asthma and endotoxin: lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in bronchoalveolar compartment. *Am J Physiol* 270 (5 Pt 1): L736-44, 1996
- DUNDER T**, Kuikka L, Turtinen J, Räsänen L, Uhari M. Diet, serum fatty acids, and atopic diseases in childhood. *Allergy* 56: 425-8, 2001
- DUNN SE**, Ousman SS, Sobel RA, Zuniga L, Baranzini SE, Youssef S, Crowell A, Loh J, Oksenberg J, Steinman L. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 204: 321-30, 2007
- EDER K**, Slomma N, Becker K. Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and alpha-linolenic acids in HepG2 cells. *J Nutr* 132: 1115-21, 2002
- EGE MJ**, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Ublagger E, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Scheynius A, Pershagen G, Benz MR, Lauener R, von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Parsifal Study team. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 117: 817-23, 2006
- ENDO M**, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med* 232: 614-21, 2007
- ENGVAL K**, Norrby C, Norbäck D. Asthma symptoms in relation to building dampness and odour in older multifamily houses in Stockholm. *Int J Tuberc Lung Dis* 5: 468-77, 2001
- ERICKSON LD**, Foy TM, Waldschmidt TJ. Murine B1 B cells require IL-5 for optimal T cell-dependent activation. *J Immunol* 166: 1531-9, 2001
- ERJEFÄLT JS**, Greiff L, Andersson M, Matsson E, Petersen H, Linden M, Ansari T, Jeffery PK, Persson CG. Allergen-induced eosinophil cytotoxicity is a primary mechanism for granule protein release in upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 304-12, 1999
- ERMERT L**, Ermert M, Merkle M, Goppelt-Strube M, Duncker HR, Grimminger F, Seeger W. Rat pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxin challenge: differential regulation in the various types of cells in the lung. *Am J Pathol* 156: 1275-87, 2000
- ERMERT M**, Kuttner D, Eisenhardt N, Dierkes C, Seeger W, Ermert L. Cyclooxygenase-2-dependent and thromboxane-dependent vascular and bronchial responses are regulated via p38 mitogen-activated protein kinase in control and endotoxin-primed rat lungs. *Lab Invest* 83: 333-47, 2003
- EVANS M**, Park Y, Pariza M, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor gamma2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 36: 1223-32, 2001
- FAJAS L**, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438: 55-60, 1998

- FAN YY, LY LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS.** Dietary docosaehaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol* 173: 6151-60, 2004
- FANARO S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V.** Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 91: 48-55, 2003
- FELESZKO W, Jaworska J, Rha RD, Steinhausen S, Avagyan A, Jaudszus A, Ahrens B, Groneberg DA, Wahn U, Hamelmann E.** Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 37: 498-505, 2007
- FREDERIKSEN KS, Wulff EM, Sauerberg P, Mogensen JP, Jeppesen L, Fleckner J.** Prediction of PPAR-alpha ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *J Lipid Res* 45: 592-601, 2004
- FREMANN D, Linseisen J, Wolfram G.** Dietary conjugated linoleic acid (CLA) intake assessment and possible biomarkers of CLA intake in young women. *Public Health Nutr* 5: 73-80, 2002
- FRITSCHKE J, Fritsche S, Salomon MB, Mossoba MM, Yurawecz MP, Morehouse K, Ku Y.** Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers in beef fat. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 667-72, 2000
- GAULLIER JM, Halse J, Høivic HO, Høye K, Syvertsen C, Nurminiemi M, Hassfeld C, Einerhand A, O'Shea M, Gudmundsen O.** Six month supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. *Br J Nutr* 97: 550-60, 2007
- GEHA RS, Jabara HH, Brodeur SR.** The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 3: 721-32, 2003
- GERSZTEN RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A.** MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-23, 1999
- GIBSON PG, Simpson JL, Saltos N.** Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 119: 1329-36, 2001
- GIERENS H, Nauck M, Roth M, Schinker R, Schürmann C, Scharnagl H, Neuhaus G, Wieland H, März W.** Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1777-83, 2000
- GILLILAND FD, Li Y, Peters JM.** Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Res Crit Care Med* 163: 429-36, 2001
- GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA.** Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute 95: 3659, 1995
- GOLD KN, Weyand CM, Goronzy JJ.** Modulation of helper T cell function by prostaglandins. *Arthritis Rheum* 37: 925-33, 1994
- GOLDYNE ME, Stobo JD.** Human monocytes synthesize eicosanoids from T lymphocyte-derived arachidonic acid. *Prostaglandins* 24: 623-30, 1982
- GOPAL PK, Gill HS.** Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br J Nutr* 84 (Suppl. 1): S69-74, 2000
- GOVINDARAJU V, Michoud MC, Al-Chalabi M, Ferraro P, Powell WS, Martin JG.** Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C957-65, 2006

- GRAY SL**, Dalla-Nora E, Vidal-Puig AJ. Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homeostasis. *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 5) : 1053-8, 2005
- GRINARI JM**, Cori BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta(9)-desaturase. *J Nutr* 130: 2285-91, 2000
- GUNSTONE FD**, Said AI. Methyl 12-Meslyloxyoleate as a source of cyclopropane esters and of conjugated octadecadienoates. *Chem Phys Lipids* 7: 121-34, 1971
- HA YL**, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-87, 1987
- HAASE C**, Jørgensen TN, Michelsen BK. Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influences T-cell priming in vivo. *Immunology* 107: 489-99, 2002
- HALKEN S**. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 15 Suppl 16: 4-5, 9-32, 2004
- HAMELMANN E**, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen G, Irvin C, Gelfand E. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156 (3 Pt 1): 766-75, 1997
- HAMELMANN E**, Tadedo K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness – a murine model. *Allergy* 54: 297-305, 1999
- HAMELMANN E**, Gelfand EW. IL-5-induced airway eosinophilia – the key to asthma? *Immunol Rev* 179: 182-91, 2001
- HAMMAD H**, de Heer HJ, Soullié T, Angeli V, Trottein F, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* 164: 263-71, 2004
- HAMMARSTEDT A**, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, Smith U. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 65-75, 2005
- HANSELMAN JC**, Vartanian MA, Koester BP, Gray SA, Essenburg AD, Rea TJ, Bisgaier CL, Pape ME. Expression of the mRNA encoding truncated PPAR alpha does not correlate with hepatic insensitivity to peroxisome proliferators. *Mol Cell Biochem* 217: 91-7, 2001
- HARBIGE LS**. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: A question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 38: 323-41, 2003
- HARFOOT CG**, Hazelwood GP. Lipid metabolism in the rumen. In: The rumen microbial ecosystem (Hobson PN, ed.), pp. 285-322, Elsevier Science Publishers, London, UK, 1988
- HAWORTH O**, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- γ and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 9: 873-9, 2008
- HAYMAN A**, MacGibbon A, Pack RJ, Rutherford K, Green JH. High intake, but not low intake, of CLA impairs weight gain in growing mice. *Lipids* 37: 689-92, 2002
- HEALY DA**, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. The effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 35: 763-8, 2000
- HEINRICH J**, Hoelscher B, Frye C, Meyer I, Wjst M, Wichmann HE. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J* 19: 1040-6, 2002

- HEINZMANN A**, Deichmann KA. Genes for atopy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 387-92, 2001
- HIRASAWA H**, Chiba T, Ueki S, Kamada Y, Ito W, Takeda M, Fujita M, Kato H, Kayaba H, Chihara J. The synthetic PPARgamma agonist troglitazone inhibits eotaxin-enhanced eosinophil adhesion to ICAM-1-coated plates. *Int Arch Allergy Immunol* 146 Suppl 1: 11-5, 2008
- HODGE L**, Peat JK, Salome C. Increased consumption of polyunsaturated oil may be a cause of increased prevalence of childhood asthma. *Aust N Z J Med* 24: 727, 1994
- HOLDEN NS**, Gong W, King EM, Kaur M, Gienbycz MA, Newton R. Potentiation of NF-kappaB-dependent transcription and inflammatory mediator release by histamine in human airway epithelial cells. *Br J Pharmacol* 152: 891-902, 2007
- HOLLINGSHEAD HE**, Morimura K, Adachi M, Kennett MJ, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM. PPARbeta/delta protects against experimental colitis through a ligand-independent mechanism. *Dig Dis Sci* 52: 2912-9, 2007
- HONDA K**, Chihara J. Eosinophil activation by eotaxin - eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy* 54: 1262-9, 1999
- HONDA K**, Marquillies P, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is expressed in airways and inhibits features of airway remodelling in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 113: 882-8, 2004
- HONG HK**, Cho YM, Park KH, Lee CT, Lee HK, Park KS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma mediated inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 62: 1-8, 2003
- HONTECILLAS R**, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4⁺ T cell-mediated protection against colitis. *J Immunol* 178: 2940-9, 2007
- HØST A**. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89 (6 Suppl 1): 33-7, 2002
- HOTCHKISS RD**. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch Biochem* 16: 131-41, 1948
- HOUSEKNECHT KL**, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 678-82, 1998
- HUSSAIN I**, Jain VV, O'Shaughnessy P, Businga TR, Kline J. Effect of nitrogen dioxide exposure on allergic asthma in a murine model. *Chest* 126: 198-204, 2004
- HWANG DM**, Kundu JK, Shin JW, Lee JC, Lee HJ, Surh YJ. Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid down-regulates phorbol ester-induced NF-kappaB activation and subsequent COX-2 expression in hairless mouse skin by targeting IkappaB kinase and PI3K-Akt. *Carcinogenesis* 28: 363-71, 2007
- ICIEK LA**, Delphin SA, Stavnezer J. CD40 cross-linking induces Ig epsilon germline transcripts in B cells via activation of NF-kappaB: synergy with IL-4 induction. *J Immunol* 158: 4769-79, 1997
- IDE T**. Interaction of fish oil and conjugated linoleic acid in affecting hepatic activity of lipogenic enzymes and gene expression in liver and adipose tissue. *Diabetes* 54: 412-23, 2005
- IJPENBERG A**, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272: 20108-17, 1997

- IMAMOTO E**, Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Tanigawa T, Yoshikawa T. Inhibitory effect of pioglitazone on expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors* 20: 37-47, 2004
- IP C**, Dong Y, Ip MM, Banni S, Carta G, Angioni E, Murru E, Spada S, Melis MP, Saebo A. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr Cancer* 43: 52-8, 2002
- IP MM**, McGee SO, Masso-Welch PA, Ip C, Meng X, Ou L, Shoemaker SF. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis* 28: 1269-76, 2007
- ISRAELIAN-KONARAKI Z**, Reaven PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Cardiology* 103: 1-9, 2005
- ISSEMANN I**, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-50, 1990
- JAKOBSEN MA**, Petersen RK, Kristiansen K, Lange M, Lillevang ST. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, delta, gamma1 and gamma2 expressions are present in human monocyte-derived dendritic cells and modulate dendritic cell maturation by addition of subtype-specific ligands. *Scand J Immunol* 63: 330-7, 2006
- JAHREIS G**, Fritsche J, Steinhart H. Conjugated linoleic acid in milk fat: High variation depending on production system. *Nutr Res* 17: 1479-84, 1997
- JAHREIS G**, Fritsche J, Möckel P, Schöne F, Möller U, Steinhart H. The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, *cis*-9,*trans*-11 C18:2, in milk of different species: Cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutr Res* 19: 1541-9, 1999
- JAHREIS G**, Kraft J. Sources of conjugated linoleic acid in the human diet. *Lipid Technol* 14: 29-32, 2002
- JAUDSZUS A**, Foerster M, Kroegel C, Wolf I, Jahreis G. *Cis*-9,*trans*-11-CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: comparison to *trans*-10,*cis*-12-CLA and to linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1737: 111-8, 2005
- JIANG J**, Wolk A, Vessby B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 70: 21-7, 1999
- JIE MS**, Pasha MK, Alam MS. Synthesis and nuclear magnetic resonance properties of all geometrical isomers of conjugated linoleic acids. *Lipids* 32: 1041-4, 1997
- JOHANSSON MW**, Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN, Mosher DF. Up-regulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol* 180: 7622-35, 2008
- JOHNSTON SL**. Natural and experimental rhinovirus infections of the lower respiratory tract. *Am J Resp Crit Care Med* 152 (4 Pt 2): S46-52, 1995
- JULIUS P**, Luttmann W, Knoechel B, Kroegel C, Matthys H, Virchow JC Jr. CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *Eur Respir J* 13: 1253-9, 1999
- JUMP DB**. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 277: 8755-8, 2002
- KAMPHIUS MM**, Lejeune MP, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *Int J Obes* 27: 840-7, 2003
- KANG K**, Liu W, Albright KJ, Park Y, Pariza MW. *Trans*-10,*cis*-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR γ expression. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 795-9, 2003

- KANG K**, Miyazaki M, Ntambi JM, Pariza MW. Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects of stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 532-7, 2004
- KANWAR RK**, MacGibbon AK, Black PN, Kanwar JR, Rowan A, Vale M, Krissansen GW. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid attenuates allergic airway disease. *Clin Exp Allergy* 38: 208-18, 2007
- KAPPERT K**, Meyborg H, Clemenz M, Graf K, Fleck E, Kintscher U, Stawowy P. Insulin facilitates monocyte migration: a possible link to tissue inflammation in insulin-resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 365: 503-8, 2008
- KARMAUS W**, Botezan C. Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review. *J Epidemiol Community Health* 56: 209-17, 2002
- KASAIAN MT**, Miller DK. IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol* 76: 147-55, 2008
- KATZ I**, Keeney M. Characterization of the octadecenoic acids in rumen digesta and rumen bacteria. *J Dairy Sci* 49: 962-6, 1966
- KAUSCH C**, Krützfeldt J, Witke A, Rettig A, Bachmann O, Rett K, Matthaei S, Machicao F, Häring HU, Stumvoll M. Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling, and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 664-74, 2001
- KE Y**, Reddel RR, Gerwin BI, Miyashita M, McMenamin M, Lechner JF, Harris CC. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* 38: 60-6, 1988
- KEEGAN AD**, Johnston JA, Tortolani PJ, McReynolds LJ, Kinzer C, O'Shea JJ, Paul WE. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7681-5, 1995
- KELLER H**, Devchand PR, Perroud M, Wahli W. PPAR alpha structure-function relationships derived from species-specific differences in responsiveness to hypolipidemic agents. *Biol Chem* 378: 651-5, 1997
- KELLERSMANN C**, Steinhart H, Francke W. Synthesis of conjugated octadienoic acids. *Lipids* 41: 777-88, 2006
- KELLEY DS**, Warren JM, Simon VA, Bartolini G, Mackey BE, Erickson KL. Similar effects of c9,t11-CLA and t10,c12-CLA on immune cell functions in mice. *Lipids* 37: 725-8, 2002
- KELLEY DS**, Erickson KL. Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal models: Benefits vs. risks. *Lipids* 38: 377-86, 2003
- KELLEY DS**, Bartolini GL, Warren JM, Simon VA, Mackey BE, Erickson KL. Contrasting effects of t10,c12- and c9,t11-conjugated linoleic acid isomers on the fatty acid profiles of mouse liver lipids. *Lipids* 39: 135-41, 2004
- KELLEY NS**, Hubbard NE, Erickson KL. Conjugated linoleic acid and cancer. *J Nutr* 137: 2599-607, 2007
- KEMP P**, White RW, Lander DJ. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J Gen Microbiol* 90: 100-14, 1975
- KEPLER CR**, Tucker WP, Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 246: 2765-71, 1971
- KHETSURIANI N**, Kazerouni NN, Erdman DD, Lu X, Redd SC, Anderson LJ. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119: 314-21, 2007

- KIM JH**, Hubbard NE, Ziboh V, Erickson KL. Attenuation of breast tumor cell growth by conjugated linoleic acid via inhibition of 5-lipoxygenase activating protein. *Biochim Biophys Acta* 1736: 244-50, 2005
- KIM JL**, Elfman L, Mi Y, Johansson M, Smedje G, Norbäck D. Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment. *Indoor Air* 15: 170-82, 2005
- KIM JL**, Elfman L, Mi Y, Wieslander G, Smedje G, Norbäck D. Indoor molds, bacteria, microbial volatile organic compounds and plasticizers in schools - associations with asthma and respiratory symptoms in pupils. *Indoor Air* 17: 153-63, 2007
- KIM JY**, Chung BH. Effects of combination dietary conjugated linoleic acid with vitamin A (retinal) and selenium on the response of the immunoglobulin production in mice. *J Vet Sci* 4: 103-8, 2003
- KIM TW**, Choi NJ, Hwangbo J, Hsu JT, Lee SS, Song MK, Seo IJ, Kim YJ. Production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid by *Megasphaera eisdenii* YJ-4: Physiological roles in the rumen. *Asian-Australasian J Anim Sci* 18: 1425-9, 2005
- KLEINJAN A**, Vinke JG, Severijnen LW, Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur Respir J* 15: 491-7, 2000
- KLIEWER SA**, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358: 771-4, 1992
- KOBAYASHI M**, Thomassen MJ, Rambasek T, Bonfield TL, Raychaudhuri B, Malur A, Winkler AR, Barna BP, Goldman SJ, Kavuru MS. An inverse relationship between peroxisome proliferators-activated receptor gamma and allergic airway inflammation in an allergen challenge model. *Ann Allergy Asthma Immunol* 95: 468-73, 2005
- KOFF JL**, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L1068-75, 2008
- KNOL J**, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Gro S, Helm K, Klarczyk M, Schöpfer H, Böckler HM, Wells J. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40: 36-42, 2005
- KNOUFF C**, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev* 25: 899-918, 2004
- KRÄMER U**, Link E, Oppermann H, Ranft U, Schäfer T, Thriene B, Behrendt H, Ring J. Studying school beginners in western and eastern Germany: allergy trends and sensitisations 1991-2000. *Gesundheitswesen* 64: 657-63, 2002
- KRAFT J**, Collomb M, Möckel P, Sieber R, Jahreis G. Differences in CLA isomer distribution in cow's milk lipids. *Lipids* 38: 657-64, 2003
- KRAFT J**, Kramer JK, Schoene F, Chambers JR, Jahreis G. Extensive analysis of long-chain polyunsaturated fatty acids, CLA, trans-18:1 isomers, and plasmalogenic lipids in different retail beef types. *J Agric Food Chem* 56: 4775-82, 2008
- KRAMER JK**, Fellner V, Dugan ME, Sauer FD, Mossoba MM, Yurawecz MP. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* 32: 1219-28, 1997
- KRAMER JK**, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, Dugan ME. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am J Clin Nutr* 79 (6 Suppl): 1137S-45S, 2004

- KRUG N**, Napp U, Enander I, Eklund E, Rieger CH, Schauer U. Intercellular expression and serum levels of eosinophil peroxidase (EPO) and eosinophil cationic protein in asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 29: 1507-15, 1999
- KUHNT K**, Kraft J, Moeckel P, Jahreis G. Trans-11-18:1 is effectively Delta9-desaturated compared with trans-12-18:1 in humans. *Br J Nutr* 95: 752-61, 2006
- KUIPER S**, Muris JW, Dompeling E, van Schayck CP, Schönberger HJ, Wesseling G, Knottnerus JA. Associations between first-degree familial predisposition of asthma and atopy (total IgE) in newborns. *Clin Exp Allergy* 36: 594-601, 2006
- KUPERMAN DA**, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, Sheppard D, Erle DJ. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 8: 885-9, 2002
- LAMPEN A**, Leifheit M, Voss J, Nau H. Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1735: 30-40, 2005
- LAROSA PC**, Riethoven JJ, Chen H, Xia Y, Zhou Y, Chen M, Miner J, Fromm ME. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes. *Physiol Genomics* 31: 544-53, 2007
- LARSEN CG**, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. Neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243: 1464-6, 1989
- LARSEN TM**, Toubro S, Gudmundsen O, Astrup A. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. *Am J Clin Nutr* 83: 606-12, 2006
- LASA A**, Churrua I, Simón E, Fernández-Quintela A, Rodriguez VM, Portillo MP. Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid does not increase body fat loss induced by energy restriction. *Br J Nutr* 29: 1-6, 2008
- LAVILLONNIÈRE F**, Chajès V, Martin JC, Sébédio JL, Lhuillery C, Bougnoux P. Dietary purified cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer has anticarcinogenic properties in chemically induced mammary tumors in rats. *Nutr Cancer* 45: 190-4, 2003
- LEE JW**, Paape MJ, Elsasser TH, Zhao X. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide. *J Dairy Sci* 86: 2382-9, 2003
- LEE KN**, Pariza MW, Ntambi JM. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 817-21, 1998
- LEESNITZER LM**, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41: 6640-50, 2002
- LEININGER MT**, Portocarrero CP, Houseknecht KL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression in porcine white blood cells: dynamic regulation with acute endotoxemia. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 749-53, 1999
- LEMANSKE RF**, Busse WW. 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl): S502-19, 2003
- LEVY BD**, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, Israel E, Haley KJ, Serhan CN. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol* 178: 496-502, 2007
- LEVY O**. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7: 379-90, 2007
- LI G**, Barnes D, Butz D, Bjorling D, Cook ME. 10t,12c-conjugated linoleic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase expression in vitro and in vivo. *J Lipid Res* 46: 2134-42, 2005

- LI H**, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2-cells: Evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Kidney Intern* 67: 867-74, 2005
- LI Q**, Wang M, Tan L, Wang C, Ma J, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. *J Lipid Res* 49: 1904-13, 2005
- LI Q**, Tan L, Wang C, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur J Nutr* 45: 144-51, 2006
- LIEW C**, Schut HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. Protection of conjugated linoleic acid against 2-amino-3-methylimidazol[4-5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16: 3037-43, 1995
- LINNEBERG A**, Ostergaard C, Tvede M, Andersen LP, Nielsen NH, Madsen F, Frølund L, Dirksen A, Jørgensen T. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol* 111: 847-53, 2003
- LIOTTA F**, Frosali F, Querci V, Mantei A, Fili L, Maggi L, Mazzinghi B, Angeli R, Ronconi E, Santarasci V, Biagioli T, Lasagni L, Ballerini C, Parronchi P, Scheffold A, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human immature myeloid dendritic cells trigger a T(H)2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction. *J All Clin Immunol* 121: 1000-5, 2008
- LITONJUA AA**, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk of childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 158: 176-81, 1998
- LIU JB**, Zhang ZX, Xu YJ, Xing LH, Zhang HL. Effects of glucocorticoid on airway mucus secretion in asthma: experiment with asthmatic mouse model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86: 2491-4, 2006 (Abstract)
- LIU JR**, Li BX, Chen BQ, Han XH, Xue YB, Yang YM, Zheng YM, Liu RH. Effect of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid on cell cycle of gastric adenocarcinoma cell line (SGC-7901). *World J Gastroenterol* 8: 224-9, 2002a
- LIU JR**, Chen BQ, Yang YM, Wang XL, Xue YB, Zheng YM, Liu RH. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid. *World J Gastroenterol* 8: 999-1004, 2002b
- LO SK**, Everitt J, Gu J, Malik AB. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD18-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 89: 981-8, 1992
- LOCK AL**, Garnsworthy PC. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and delta9-desaturase activity in dairy cows. *Livestk Prod Sci* 79: 47-59, 2003
- LOSCHER CE**, Draper E, Leavy O, Kelleher D, Mills KH, Roche HM. Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J Immunol* 175: 4990-8, 2005
- LUTTMANN W**, Matthiesen T, Matthys H, Virchow JC Jr. Synergistic effects of interleukin-4 or interleukin-13 and tumor necrosis factor- α on eosinophil activation *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 474-80, 1999
- MAIURI MC**, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 457-65, 2005
- MAKINO S**, Fukuda T. Eosinophils and allergy in asthma. *Allergy Proc* 16: 13-21, 1995
- MAN MQ**, Barish GD, Schmuth M, Crumrine D, Barak Y, Chang S, Jiang Y, Evans RM, Elias PM, Feingold KR. Deficiency of PPAR β /delta in the epidermis results in defective cutaneous permeability barrier homeostasis and increased inflammation. *J Invest Dermatol* 128: 370-7, 2008

- MANDARD S**, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 61: 393-416, 2004
- MANDARD S**, Stienstra R, Escher P, Tan NS, Kim I, Gonzalez FJ, Wahli W, Desvergne B, Müller M, Kersten S. Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1145-57, 2007
- MANN BS**, Chung KF. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res* 7: 59, 2006
- MARINI M**, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 89: 1001-9, 1992
- MARION-LETELLIER R**, Butler M, Déchelotte P, Playford RJ, Ghosh S. Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells – potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation. *Am J Clin Nutr* 87: 939-48, 2008
- MARKS GB**. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 285-9, 2006
- MARTIGNON G**, Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I. Does childhood immunization against infectious diseases protect from the development of atopic disease? *Pediatr Allergy Immunol* 16: 193-200, 2005
- MARTIN G**, Schoonjans K, Lefebvre A, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transporter protein (FATP) and acyl CoA synthetase (ACS) genes by PPAR α and PPAR γ activators. *J Biol Chem* 272: 28210-17, 1997
- MASSO-WELCH PA**, Zangani D, Ip C, Vaughan MM, Shoemaker SF, McGee SO, Ip MM. Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *J Nutr* 134: 299-307, 2004
- MATSUBARA M**, Ohmori K, Hasegawa K. Histamine H1 receptor-stimulated interleukin 8 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by bronchial epithelial cells requires extracellular signal-regulated kinase signaling via protein kinase C. *Int Arch Allergy Immunol* 139: 279-93, 2006
- MATSUWAKI Y**, Ueki S, Adachi T, Oyamada H, Kamada Y, Yamaguchi K, Kanda A, Hamada K, Kayaba H, Chihara J. The synthetic PPARgamma agonist troglitazone inhibits IL-5-induced CD69 upregulation and eosinophil-derived neurotoxin release from eosinophils. *Pharmacology* 74: 169-73, 2005
- MAZIAK W**, Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK, Keil U. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase II in Münster, Germany. *Allergy* 58: 572-9, 2003
- MCMILLAN RM**. Leukotrienes in respiratory disease. *Paediatr Respir Rev* 2: 238-44, 2001
- MCNAMARA PS**, Smyth RL. Interleukin-9 as a possible therapeutic target in both asthma and chronic obstructive airway disease. *Drug News Perspect* 18: 615-21, 2005
- MEDINA-GOMEZ G**, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppänen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 3: e64, 2007
- MEDZHITOV R**, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-7, 1997

- MENG X**, Shoemaker S, McGee SO, Ip MM. t10,c12-Conjugated linoleic acid stimulates mammary tumor progression in her2/erbB2 mice through activation of both proliferative and survival pathways. *Carcinogenesis* 29: 1013-21, 2008
- MENSINK GB**, Lampert T, Bergmann E. Overweight and obesity in Germany 1984-2003. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48: 1348-56, 2005
- MICHALIK L**, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 1771: 991-8, 2007
- MICKLEBOROUGH TD**, Rundell KW. Dietary polyunsaturated fatty acids in asthma- and exercise-induced bronchoconstriction. *Eur J Clin Nutr* 59: 1335-46, 2005
- MICKLEBOROUGH TD**, Lindley MR, Ionescu AA, Fly AD. Protective effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *Chest* 129: 39-49, 2006
- MILES EA**, Aston L, Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on T helper type 1 and T helper type 2 cytokine production in human whole-blood cultures. *Clin Exp Allergy* 33: 624-32, 2003
- MILLER CC**, Park Y, Pariza MW, Cook ME. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 1107-12, 1994
- MILLER JR**, Siripurkpong P, Hawes J, Majdalawieh A, Ro HS, McLeod RS. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. *J Lipid Res* 49: 550-62, 2008
- MILLER LS**, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL. TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol* 174: 6137-43, 2005
- MISRA P**. AMP activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control. *Expert Opin Ther Targets* 12: 91-100, 2008
- MIYAURA N**, Sugimoto H. New stereospecific syntheses of pheromone bombykol and its three geometrical isomers. *Tetrahedron* 39: 3271-7, 1983
- MOLONEY F**, Toomey S, Noone E, Nugent A, Allan B, Loscher CE, Roche HM. Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes* 56: 574-82, 2007
- MONNAI M**, Horimoto Y, Otani H. Immunomodulatory effect of dietary bovine kappa-caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice. *Milchwissenschaft* 53: 129-32, 1998
- MORAES LA**, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 110: 371-85, 2006
- MOSMANN TR**, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-73, 1989
- MOSMANN TR**, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-46, 1996
- MOUGIOS V**, Matsakas A, Petridou A, Ring S, Sagredos A, Melissopoulou A, Tsigilis N, Nikolaidis M. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem* 12: 585-94, 2001
- MOYA-CAMARENA SY**, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J Lipid Res* 40: 1426-33, 1999

- MUELLER C**, Weaver V, Vanden Heuvel JP, August A, Cantorna MT. Peroxisome proliferators-activated receptor γ ligands attenuate immunological symptoms of experimental allergic asthma. *Arch Biochem Biophys* 418: 186-96, 2003
- MÜLLER A**, Ringseis R, Düsterloh K, Gahler S, Eder K, Steinhart H. Detection of conjugated dienoic fatty acids in human vascular smooth muscle cells treated with conjugated linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1737: 145-51, 2005
- NADRA K**, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 26: 3266-81, 2006
- NAGAKURA T**, Matsuda S, Shichijyo K, Sugimoto H, Hata K. Dietary supplementation with fish oil rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *Eur Respir J* 16: 861-5, 2000
- NENCIONI A**, Grünebach F, Zobywlaski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P. Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 169: 1228-35, 2002
- NEWBURG DS**, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 61: 2-8, 2007
- N'GUESSAN PD**, Hippenstiel S, Etouem MO, Zahlten J, Beermann W, Lindner D, Opitz B, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N, Schmeck B. Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L1131-8, 2006
- NICHOLS PL JR**, Herb SF, Riemenschneider RW. Isomers of conjugated fatty acids. I. Alkali-isomerized linoleic acid. *J Am Chem Soc* 73: 247-52, 1951
- NICOLOSI RJ**, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22: 266-77, 1997
- NORZILA MZ**, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (3 Pt 1): 769-74, 2000
- OCHOA JJ**, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD, Wahle KW. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis* 25: 1185-91, 2004
- ODDERA S**, Silvestri M, Balbo A, Jovovich BO, Penna R, Crimi E, Rossi GA. Airway eosinophilic inflammation, epithelial damage, and bronchial hyperresponsiveness in patients with mild-moderate, stable asthma. *Allergy* 51: 100-7, 1996
- OLSZEWSKA-PAZDRAK B**, Pazdrak K, Ogra PL, Garofalo RP. Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism. *J Immunol* 160: 4889-95, 1998
- OSBORNE TF**. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 275: 32379-82, 2000
- O'SHEA M**, Devery R, Lawless F, Murphy J, Stanton C. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of mammary MCF-7-cancer cells. *Anticancer Res* 20: 3591-601, 2000
- O'SHEA M**, Bassaganya-Riera J, Mohede IC. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 79 (6 Suppl): 1199S-206S, 2004
- OTANI H**, Monnai M, Kawasaki Y, Kawakami H, Tanimoto M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine kappa-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *J Dairy Res* 62: 349-57, 1995a

- OTANI H**, Yamada Y. Effects of bovine kappa-casein and lactoferrins on several experimental models of allergic disease. *Milchwissenschaft* 50: 549-53, 1995b
- OU L**, Wu Y, Ip C, Meng X, Hsu YC, Ip MM. Apoptosis induced by t10,c12-conjugated linoleic acid is mediated by an atypical endoplasmic reticulum stress response. *J Lipid Res* 49: 985-94, 2008
- OYAMADA H**, Kamada Y, Saito N, Tsuda A, Urayama O, Yamada H, Hirasawa H, Yamaguchi K, Ueki S, Chihara J. RANTES production from mononuclear cells in response to the specific allergen in asthma patients. *Allergol Int* 55: 253-9, 2006
- PARK CS**, Choi YS, Ki SY, Moon SH, Jeong SW, Uh ST, Kim YH. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. *Eur Respir J* 12: 872-8, 1998
- PARK GY**, Christman JW. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L797-805, 2006
- PARK Y**, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34: 235-41, 1999
- PASCERI V**, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101: 235-8, 2000
- PASCUAL G**, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437: 759-63, 2005
- PATEL H**, Belvisi M, Bishop-Bailey D, Yacoub M, Mitchell J. Activation of peroxisome proliferators-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *J Immunol* 170: 2663-9, 2003
- PAUKKERI EL**, Leppänen T, Sareila O, Vuolteenaho K, Kankaanranta H, Moilanen E. PPARalpha agonists inhibit nitric oxide production by enhancing iNOS degradation in LPS-treated macrophages. *Br J Pharmacol* 152: 1081-91, 2007
- PAWANKAR R**, Ra C. IgE-Fc epsilonRI-mast cell axis in the allergic cycle. *Clin Exp Allergy* 28 (Suppl 3): 6-14, 1998
- PENDERS J**, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 56: 661-7, 2007
- PETERSON DG**, Matitashvili E, Bauman DE. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J Nutr* 133: 3098-102, 2003
- PIPEROVA LS**, Sampugna J, Teter BB, Kalscheur KF, Yurawecz MP, Ku Y, Morehouse KM, Erdman RA. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J Nutr* 132: 1235-41, 2002
- PLOURDE M**, Jew S, Cunnane SC, Jones PJ. Conjugated linoleic acids: why the discrepancy between animal and human studies? *Nutr Rev* 66: 415-21, 2008
- POIRIER H**, Shapiro JS, Kim RJ, Lazar MA. Nutritional supplementation with trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes* 55: 1634-41, 2006
- PRIVALSKY ML**. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66: 315-60, 2004

- PUGIN J**, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2744-8, 1993
- RAJAKANGAS J**, Basu S, Salminen I, Mutanen M. Adenoma growth stimulation by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) is associated with changes in mucosal NF-kappaB and cyclin D1 protein levels in the Min mouse. *J Nutr* 133: 1943-8, 2003
- RAMOS R**, Mascarenhas J, Duarte P, Vicente C, Casteleiro C. Conjugated Linoleic Acid-Induced Toxic Hepatitis: First Case Report. *Dig Dis Sci*, 2008, DOI 10.1007/s10620-008-0461-1
- RASOOLY R**, Kelley DS, Greg J, Mackey BE. Dietary trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid reduces the expression of fatty acid oxidation and drug detoxification enzymes in mouse liver. *Br J Nutr* 97: 58-66, 2007
- REDDEL RR**, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate co-precipitation with a plasmid containing SV40 early regions genes. *Cancer Res* 48: 1904-9, 1988
- REDDY RC**. Immunomodulatory role of PPAR-gamma in alveolar macrophages. *J Investig Med* 56: 522-7, 2008
- REINHOLD D**, Biton A, Goihl A, Pieper S, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, Bank U, Täger M, Ansorge S, Brocke S. Dual inhibition of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N suppresses inflammatory immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1110: 402-9, 2007
- RENAULD JC**. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 54: 577-89, 2001
- RIBOT J**, Portillo MP, Picó C, Macarulla MT, Palou A. Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in hamsters fed an atherogenic diet. *Br J Nutr* 97: 1074-82, 2007
- RICOTE M**, Li A, Willson T, Kelly C, Glass C. The peroxisome-proliferator activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82, 1998
- RIEDLER J**, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E, ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358: 1129-22, 2001
- RIGOLI L**, Salpietro DC, Lavallo R, Cafiero G, Zuccarello D, Barberi I. Allelic association of gene markers on chromosome 11q in Italian families with atopy. *Acta Paediatr* 89: 1056-61, 2000
- RINGSEIS R**, Müller A, Herter C, Gahler S, Steinhart H, Eder K. CLA isomers inhibit TNF α -induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR γ ligand-like action. *Biochim Biophys Acta* 1760: 290-300, 2006
- RINGSEIS R**, Gahler S, Eder K. Conjugated linoleic acid isomers inhibit platelet-derived growth factor-induced NF-kappaB transactivation and collagen formation in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Nutr* 47: 59-67, 2008
- RISÉRUS U**, Arner P, Brismar K, Vessby B. Treatment with trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25: 1516-21, 2002a
- RISÉRUS U**, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Arnlöv J, Vessby B. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation* 106: 1925-9, 2002b
- RISÉRUS U**, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, Fang Z, Hegde P, Richards D, Sarov-Blat L, Strum JC, Basu S, Cheeseman J, Fielding BA, Humphreys SM, Danoff T, Moore NR, Murgatroyd P, O'Rahilly S, Sutton P, Willson T, Hassall D, Frayn KN, Karpe F. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic

abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* 57: 332-9, 2008

RODRIGUEZ-CALVO R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, Palomer X, Laguna JC, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes* 57: 2149-57, 2008

ROMANET-MANENT S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D, and the EGEA Cooperative Group. Allergic vs. nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy* 57: 607-13, 2002

ROMIEU I, Torrent M, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Ribas-Fitó N, Antó JM, Sunyer J. Maternal fish intake during pregnancy and atopy and asthma in infancy. *Clin Exp Allergy* 37: 518-25, 2007

ROPER RL, Phipps RP. Prostaglandin E2 regulation of the immune response. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 22: 101-11, 1994

SALLUSTO F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400, 1995

SALMINEN I, Mutanen M, Jauhiainen M, Aro A. Dietary trans fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum. *J Nutr Biochem* 9: 93-8, 1998

SANTOS AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol* 201: 22-32, 2000

SAUSENTHALER S, Kompauer I, Borte M, Herbarth O, Schaaf B, Berg A, Zutavern A, Heinrich J; LISA Study Group. Margarine and butter consumption, eczema and allergic sensitization in children. The LISA birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 17: 85-93, 2006

SAUSENTHALER S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, von Berg A, Wichmann HE, Heinrich J; the LISA Study Group. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 85: 530-7, 2007

SAVILAHTI E, Siltanen M, Kajosaari M, Vaarala O, Saarinen KM. IgA antibodies, TGF-beta1 and -beta2, and soluble CD14 in the colostrum and development of atopy by age 4. *Pediatr Res* 58: 1300-5, 2005

SCHLEIMER RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, McIntyre BW, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 148: 1086-92, 1992

SCHLESER S, Ringseis R, Eder K. Conjugated linoleic acids have no effect on TNF alpha-induced adhesion molecule expression, U937 monocyte adhesion, and chemokine release in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 186: 337-44, 2006

SCHMECK B, Zahlten J, Moog K, van Laak V, Huber S, Hocke AC, Opitz B, Hoffmann E, Kracht M, Zerrahn J, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem* 279: 53241-7, 2004

SCHMECK B, Moog K, Zahlten J, van Laak V, N'Guessan PD, Opitz B, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res* 7: 98, 2006

SCHOONJANS K, Staels B, Auwerx J. Role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37: 907-25, 1996

- SCHULZ C**, Farkas L, Wolf K, Krätzel K, Eissner G, Pfeifer M. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and typeII-like pneumocytes (A-549). *Scand J Immunol* 56: 294-302, 2002
- SÉBÉDIO JL**, Juanéda P, Grégoire S, Chardigny JM, Martin JC, Ginies C. Geometry of conjugated double bonds of CLA isomers in a commercial mixture and in their hepatic 20:4 metabolites. *Lipids* 34: 1319-25, 1999
- SEEDORF U**, Aberle J. Emerging roles of PPARdelta in metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1771: 1125-31, 2007
- SEHAT N**, Rickert R, Mossoba MM, Kramer JK, Yurawecz MP, Roach JA, Adlof RO, Morehouse KM, Fritsche J, Eulitz KD, Steinhart H, Ku Y. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 34: 407-13, 1999
- SEKI N**, Bujo H, Jiang M, Shibasaki M, Takahashi K, Hashimoto N, Saito Y. A potent activator of PPARalpha and gamma reduces the vascular cell recruitment and inhibits the intimal thickening in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 178: 1-7, 2005
- SENN JJ**, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278: 13740-6, 2003
- SEPP E**, Julge K, Vasar M, Naaber P, Björkstén B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 86: 956-61, 1997
- SERHAN C**, Devchand P. Novel antiinflammatory targets for asthma. A role for PPARγ? *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 658-61, 2001
- SHAH NP**. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr* 84 Suppl 1: S3-10, 2000
- SHARMA HP**, Hansel NN, Matsui E, Diette GB, Eggleston P, Breyse P. Indoor environmental influences on children's asthma. *Pediatr Clin North Am* 54: 103-20, 2007
- SHIMANO H**. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Proc Lipid Res* 40: 439-52, 2001
- SHU H**, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, Wright SD, Cai TQ. Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 345-9, 2000
- SHUTE J**. Interleukin-8 is a potent eosinophil chemo-attractant. *Clin Exp Allergy* 24: 203-6, 1994
- SIDDIQUI RA**, Harvey KA, Zaloga GP, Stillwell W. Modulation of lipid rafts by Omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. *Nutr Clin Pract* 22: 74-88, 2007
- SIEBER R**, Collomb M. Bildung von konjugierten Linolsäuren durch Starterkulturen. *AGRARForschung* 11: 60-5, 2004
- SIMON DM**, Alikian MC, Srisuma S, Bhattacharya S, Andalcio T, Shapiro SD, Mariani TJ. Epithelial cell PPARgamma is an endogenous regulator of normal lung maturation and maintenance. *Proc Am Thorac Soc* 3: 510-1, 2006
- SLOMMA N**, Becker K, Eder K. The effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acids on delta4-desaturation in HepG2 cells. *Int J Vitam Nutr Res* 74: 243-6, 2004
- SMEDMAN A**, Vessby B, Basu S. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by alpha-tocopherol and cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Sci (Lond)* 106: 67-73, 2004
- SMITH WL**. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr Opin Cell Biol* 17: 174-82, 2005

- SOEL SM**, Choi OS, Bang MH, Yoon Park JH, Kim WK. Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells in vitro and in vivo. *J Nutr Biochem* 18: 650-7, 2007
- SOMMERHOFF CP**, Schaschke N. Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story. *Curr Pharm Des* 13: 313-32, 2007
- SON SM**, Kang JH, Lee GS, Jeung EB, Yang MP. Induction of interleukin-8 expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by trans10-cis12 conjugated linoleic acid. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 284-9, 2006
- SONG HJ**, Grant I, Rotondo D, Mohede I, Sattar N, Heys SD, Wahle KW. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 59: 508-17, 2005
- SPRECHER DL**, Massien C, Pierce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM, Hassall DG, Ancellin N, Patterson SD, Lobe DC, Johnson TG. Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 359-65, 2007
- STACHOWSKA E**, Bańkiewicz-Masiuk M, Dziedziczko V, Adler G, Bober J, Machaliński B, Chlubek D. Conjugated linoleic acids can change phagocytosis of human monocytes/ macrophages by reduction in Cox-2 expression. *Lipids* 42: 707-16, 2007
- STACHOWSKA E**, Bańkiewicz-Masiuk M, Dziedziczko V, Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz M, Dołęgowska B, Wiszniewska B, Machaliński B, Chlubek D. Conjugated linoleic acid increases intracellular ROS synthesis and oxygenation of arachidonic acid in macrophages. *Nutrition* 24: 187-99, 2008
- STAELS B**, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98: 2088-93, 1998
- STEINBRINK K**, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159: 4772-80, 1997
- STEINHART C**. Conjugated linoleic acid – The good news about animal fat. *JCE* 73(12): A302-3, 1996
- STEINHART H**, Rickert R, Winkler K. Identification and analysis of conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Eur J Med Res* 8: 370-2, 2003
- STEPPAN CM**, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 25: 1569-75, 2005
- STOECK M**, Ruegg C, Miescher S, Carrel S, Cox D, Von Flidner V, Alkan S. Comparison of the immunosuppressive properties of milk growth factor and transforming growth factors beta 1 and beta 2. *J Immunol* 143: 3258-65, 1989
- STRACHAN DP**. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259-60, 1989
- STRIZ I**, Mio T, Adachi Y, Bazil V, Rennard S. The CD14 molecule participates in regulation of IL-8 and IL-6-release by bronchial epithelial cells. *Immunol Lett* 62: 177-81, 1998
- SUBBARAMAIAH K**, Lin D, Hart J, Dannenberg A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 276: 12440-8, 2001
- SUGANO M**, Tsujita A, Yamasaki M, Noguchi M, Yamada K. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 33: 521-7, 1998
- SUGAWARA A**, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 142: 3125-34, 2001

- SUZUKAWA M**, Hirai K, Iikura M, Nagase H, Komiya A, Yoshimura-Uchiyama C, Yamada H, Ra C, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. IgE- and FcεRI-mediated migration of human basophils. *Int Immunol* 17: 1249-55, 2005
- SWAIN SL**, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of TH2-like helper/effectors. *J Immunol* 145: 3796-806, 1990
- TAKAFUJI S**, Ohtoshi T, Takizawa H, Tadokoro K, Ito K. Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells. Effect of cytokines and role of adhesion. *J Immunol* 156: 3980-5, 1996
- TAKAFUJI S**, Ishida A, Miyakuni Y, Nakagawa T. Matrix metalloproteinase-9 release from human leukocytes. *J Invest Allergol Clin Immunol* 13: 50-5, 2003
- TAKAHASHI Y**, Kushiro M, Shinohara K, Ide T. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. *Biochem Biophys Acta* 1631: 265-73, 2003
- TAKEHARA H**, Iwamoto J, Mizokami Y, Takahashi K, Ootubo T, Miura S, Narasaka T, Takeyama H, Omata T, Shimokobe K, Ito M, Matsuoka T. Involvement of cyclooxygenase-2–prostaglandin E2 pathway in interleukin-8 production in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci* 51: 2188-97, 2006
- TAN NS**, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, Flühmann B, Desvergne B, Wahli W. Critical roles of PPARβ/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 15: 3263-77, 2001
- TANABE J**, Tamasawa N, Yamashita M, Matsuki K, Murakami H, Matsui J, Sugimoto K, Yasujima M, Suda T. Effects of combined PPARγ and PPARα agonist therapy on reverse cholesterol transport in the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes Obes Metab*, 2007, DOI 10.1111/j.1463-1326.2007.00810.x
- TANAKA T**, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nakao K. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptorγ expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 42: 702-10, 1999
- TARCIN O**, Bajaj M, Akalin S. Insulin resistance, adipocyte biology, and thiazolidinediones: a review. *Metab Syndr Relat Disord* 5: 103-15, 2007
- TAVAKOLI S**, Cowan MJ, Benfield T, Logun C, Shelhamer JH. Prostaglandin E(2)-induced interleukin-6 release by a human airway epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L127-33, 2001
- TEMANN UA**, Laouar Y, Eynon EE, Homer R, Flavell RA. IL-9 leads to airway inflammation by inducing IL-13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol* 19: 1-10, 2007
- TENENBAUM A**, Motro M, Fisman EZ, Tanne D, Boyko V, Behar S. Bezafibrate for the secondary prevention of myocardial infarction in patients with metabolic syndrome. *Arch Intern Med* 165: 1154-60, 2005
- THE INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD (ISAAC) STEERING COMMITTEE**. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema; ISAAC. *The Lancet* 351: 1225-32, 1998
- THOLSTRUP T**, Raff M, Straarup EM, Lund P, Basu S, Bruun JM. An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *J Nutr* 138: 1445-51, 2008
- TRAVES SL**, Donnelly LE. Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med* 8: 416-26, 2008
- TRICON S**, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, Grimble RF, Williams CM, Yaqoob P, Calder PC. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 80: 614-20, 2004

- TRIFILIEFF A**, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker B. PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol* 139: 163-71, 2003
- TSUBOYAMA-KASAOKA N**, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49: 1534-42, 2000
- TSUZUKI T**, Ikeda I. Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat intestines, and similar absorption rates of 9c,11t-conjugated linoleic acid and 10t,12c-conjugated linoleic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2034-40, 2007
- TURPEINEN AM**, Mutanen M, Salminen I, Basu S, Palmquist DL, Griinari JM. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr* 76: 504-10, 2002
- TURPEINEN AM**, Ylönen N, von Willebrand E, Basu S, Aro A. Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy. *Br J Nutr* 100: 112-9, 2008
- UHLIG S**, Göggel R, Engel S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep* 57 Suppl: 206-21, 2005
- URQUHART P**, Parkin SM, Rogers JS, Bosley JA, Nicolaou A. The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1580: 150-60, 2002
- VALEILLE K**, Férézou J, Parquet M, Amsler G, Grippo D, Quignard-Boulangé A, Martin JC. The natural concentration of the conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11, in milk fat has anti-atherogenic effects in hyperlipidemic hamsters. *J Nutr* 136: 1305-10, 2006
- VAN CAUWENBERGE PB**. Nasal sensitization. *Allergy* 52 (33 Suppl): 7-9, 1997
- VAN HOFFEN E**, Ruiter B, Faber J, M'rabet L, Knol EF, Stahl B, Arslanoglu S, Moro G, Boehm G, Garssen J. A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. *Allergy*, 2008, DOI 10.1111/j.1398-9995.2008.01765.x
- VAN RIJLT LS**, Vos N, Willart M, Kleinjan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114: 166-73, 2004
- VERBOUT NG**, Lorton JK, Jacoby DB, Fryer AD. Atropine pretreatment enhances airway hyperreactivity in antigen-challenged guinea pigs through an eosinophil-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1126-35, 2007
- VISWANADHA S**, McGilliard ML, Herbein JH. Desaturation indices in liver, muscle, and bone of growing male and female mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *Lipids* 41: 763-70, 2006
- VODYANIK MA**, Slukvin II. Directed differentiation of human embryonic stem cells to dendritic cells. *Methods Mol Biol* 407: 275-93, 2007
- VON MUTIUS E**, Weiland SK, Fritzsche C, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 351: 862-6, 1998
- VON MUTIUS E**, Radon K. Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am* 28: 631-47, 2008
- WADA M**, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, Yuan C, Warnock M, Schmaier AH, Yokoyama C, Smyth EM, Wilson SJ, FitzGerald GA, Garavito RM, Sui de X, Regan JW, Smith WL. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem* 282: 22254-66, 2007

- WAHN U.** What drives the allergic march? *Allergy* 55: 591-9, 2000
- WALLACE RJ,** McKain N, Shingfield KJ, Devillard E. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J Lipid Res* 48: 2247-54, 2007
- WALTER DM,** McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, Umetsu DT. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway-hyperreactivity. *J Immunol* 167: 4668-75, 2001
- WANG A,** Dai X, Luu B, Conrad DJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 688-93, 2001
- WANG H,** Shen H, Lee JJ, Lee NA. CD69 expression on airway eosinophils and airway inflammation in a murine model of asthma. *Chin Med J* 119: 1983-90, 2006
- WANG K,** Zhou Z, Zhang M, Fan L, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lincoff AM, Schmidt AM, Topol EJ, Penn MS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma down-regulates receptor for advanced glycation end products and inhibits smooth muscle cell proliferation in a diabetic and nondiabetic rat carotid artery injury model. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 37-43, 2006
- WANG LS,** Huang YW, Liu S, Chang HL, Ye W, Shu S, Sugimoto Y, Funk JA, Smeaks DD, Hill LN, Lin YC. Conjugated linoleic acid (CLA) modulates prostaglandin E2 (PGE2) signaling in canine mammary cells. *Anticancer Res* 26: 889-98, 2006
- WANG P,** Anderson PO, Chen S, Paulsson KM, Sjogren HO, Li S. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int Immunopharmacol* 1: 803-12, 2001
- WANG Y,** Jones PJ. Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *Am J Clin Nutr* 79 (6 Suppl): 1153S-8S, 2004
- WARREN JM,** Simon VA, Bartolini G, Erickson KL, Mackey BE, Kelley DS. Trans-10,cis-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. *Lipids* 38: 497-504, 2003
- WASER M,** Michels KB, Bieli C, Flöistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrlander C, PARSIFAL Study team. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37: 661-70, 2007
- WATRAS AC,** Buchholz AC, Close RN, Zhang Z, Schoeller DA. The role of conjugated linoleic acid in reducing body fat and preventing holiday weight gain. *Int J Obes (Lond)* 31: 481-7, 2007
- WEDI B,** Raap U, Lewrick H, Kapp A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 100: 536-43, 1997
- WHIGHAM LD,** Cook EB, Stahl JL, Saban R, Bjorling DE, Pariza MW, Cook ME. CLA reduces antigen-induced histamine and PGE(2) release from sensitized guinea pig tracheae. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R908-12, 2001
- WHIGHAM LD,** O'Shea M, Mohede IC, Walaski HP, Atkinson RL. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. *Food Chem Toxicol* 42: 1701-9, 2004
- WICK KR,** Berton MT. IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes. *Mol Immunol* 37: 641-52, 2000
- WIESLANDER G,** Norbäck D, Björnsson E, Janson C, Boman G. Asthma and the indoor environment: the significance of emission of formaldehyde and volatile organic compounds from newly painted indoor surfaces. *Int Arch Occup Environ Health* 69: 115-24, 1997

- WIJGA AH**, Smit HA, Kerkhof M, de Jongste JC, Gerritsen J, Neijens HJ, Boshuizen HC, Brunekreef B; PIAMA. Association of consumption of products containing milk fat with reduced asthma risk in pre-school children: the PIAMA birth cohort study. *Thorax* 58: 567-72, 2003
- WOERLY G**, Honda K, Loyens M, Papin J, Auwerx J, Staels B, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med* 198: 411-21, 2003
- WOHLFERT EA**, Nichols FC, Nevius E, Clark RB. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPARgamma-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 178: 4129-35, 2007
- WOLKERSTORFER A**, Wahn U, Kjellman NI, Diepgen TL, De Longueville M, Oranje AP. Natural course of sensitization to cow's milk and hen's egg in childhood atopic dermatitis: ETAC study group. *Clin Exp Allergy* 32: 70-3, 2002
- WONG CK**, Wang CB, Li ML, Ip WK, Tian YP, Lam CW. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells: involvement of p38 MAPK and NF-kappaB. *Int Immunopharmacol* 6: 1859-71, 2006
- WONG CW**, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol* 74: 323-9, 1996
- WOODS RK**, Walters EH, Raven JM, Wolfe R, Ireland PD, Thien FC, Abramson MJ. Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. *Am J Clin Nutr* 78: 414-21, 2003
- XU HE**, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3: 397-403, 1999
- XU HE**, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JL, Oplinger JA, Kliewer SA, Gampe RT Jr, McKee DD, Moore JT, Willson TM. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci* 98: 13919-24, 2001
- XU J**, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, Bleecker ER, Meyers DA. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet* 67: 1163-73, 2000
- YAMADA P**, Zarrouk M, Kawasaki K, Isoda H. Inhibitory effect of various Tunisian olive oils on chemical mediator release and cytokine production by basophilic cells. *J Ethnopharmacol* 116: 279-87, 2008
- YAMASAKI M**, Chujo H, Koga Y, Oishi A, Rikimaru T, Shimada M, Sugimachi K, Tachibana H, Yamada K. Potent cytotoxic effect of the *trans*10, *cis*12 isomer of conjugated linoleic acid on rat hepatoma dRLh-84 cells. *Cancer Lett* 188: 171-80, 2002
- YAMASAKI M**, Chujo H, Hirao A, Koyanagi N, Okamoto T, Tojo N, Oishi A, Iwata T, Yamauchi-Sato Y, Yamamoto T, Tsutsumi K, Tachibana H, Yamada K. Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid. *J Nutr* 133: 784-8, 2003
- YAMASAKI M**, Miyamoto Y, Chujo H, Nishiyama K, Tachibana H, Yamada K. *Trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid induces mitochondria-related apoptosis and lysosomal destabilization in rat hepatoma cells. *Biochem Biophys Acta* 1735: 176-84, 2005
- YANG M**, Cook ME. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med* 228: 51-8, 2003
- YANG Y**, Chen B, Xue Y, Zheng Y. Effects of *c9*, *t11*-conjugated linoleic acid on the metastasis of human gastric carcinoma cell line. *Wei Sheng Yan Jiu* 32: 117-9, 2003 (Abstract)

- YANG P**, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter DG, Madden T, Klein RD, Fischer SM, Newman RA. Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E3 from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. *J Lipid Res* 45: 1030-9, 2004
- YONEMITSU S**, Nishimura H, Shintani M, Inoue R, Yamamoto Y, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Hayashi T, Nakao K. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. *Diabetes* 50: 1093-101, 2001
- YOON MJ**, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 55: 2562-70, 2006
- YOSHIHARA S**, Yamada Y, Abe T, Lindén A, Arisaka O. Association of epithelial damage and signs of neutrophil mobilization in the airways during acute exacerbations of paediatric asthma. *Clin Exp Immunol* 144: 212-16, 2006
- YOSHIKAWA T**, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hastay AH, Sato R, Sone H, Osuga J, Ishibashi S, Yamada N. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 17: 1240-54, 2003
- YOSHIMURA C**, Yamaguchi M, Iikura M, Izumi S, Kudo K, Nagase H, Ishii A, Walls AF, Ra C, Iwata T, Igarashi T, Yamamoto K, Hirai K. Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J Allergy Clin Immunol* 109: 817-23, 2002
- YU Y**, Correll PH, Vanden Heuvel JP. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1581: 89-99, 2002
- YUN HS**, Do SH, Jeong WI, Yang HJ, Yuan DW, Hong IH, Lee HR, Lee IS, Kim YK, Choi MS, Kim HA, Jeong KS. Cytotoxic effects of the conjugated linoleic acid isomers t10c12, c9t11-CLA and mixed form on rat hepatic stellate cells and CCl4-induced hepatic fibrosis. *J Nutr Biochem* 19: 175-83, 2008
- ZABALA A**, Churrua I, Fernández-Quintela A, Rodriguez VM, Macarulla MT, Martinez JA, Portillo MP. trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. *Br J Nutr* 95: 1112-9, 2006a
- ZABALA A**, Portillo MP, Macarulla MT, Rodriguez VM, Fernández-Quintela A. Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 CLA isomers on liver and adipose tissue fatty acid profile in hamsters. *Lipids* 41: 993-1001, 2006b
- ZAK I**, Balcerzyk A, Sarecka B, Niemiec P, Cierniewski Z, Dylag S. Contemporaneous carrier-state of two or three "proatherosclerotic" variants of APOE, ICAM1, PPARG and PAI-1 genes differentiate CAD patients from healthy individuals. *Clin Chim Acta* 362: 110-8, 2005
- ZAMBELL KL**, Keim NL, Van Loan MD, Gale B, Benito P, Kelley DS, Nelson GJ. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* 35: 777-82, 2000
- ZANINI A**, Chetta A, Saetta M, Baraldo S, D'Ippolito R, Castagnaro A, Neri M, Olivieri D. Chymase-positive mast cells play a role in the vascular component in the airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120: 329-33, 2007
- ZHU Y**, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative

promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7921-5, 1995

ZIEGLER SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12: 456-65, 1994

ZIMMERMAN BJ, Holt JW, Paulson JC, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Todd RF 3rd, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of lipid mediator-induced leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules. *Am J Physiol* 266 (3 Pt 2): H847-53, 1994

9 Anhang

9.1 Effekte von GW9662 in der Negativkontrolle

Mögliche eigene Effekte des selektiven PPAR γ -Antagonisten GW9662 wurden in einer Negativkontrollgruppe bewertet. Dazu wurde diese Gruppe scheinimmunisiert und bekam über die gesamte Studiendauer (39 d) eine mit Olivenöl supplementierte LA-arme Diät. Die Coadministration von GW9662 erfolgte dem Protokoll entsprechend (\uparrow 3.5) vor und während der Atemwegschallenges.

Gegenüber der Kontrolle PBS (Primäre Prävention, \uparrow 4.6, 4.7.1, 4.7.2) waren weder die Atemwegsreaktivität noch die in der BAL bestimmten Parameter für Atemwegsentszündung nach inhalativer Applikation von GW9662 erhöht (Tab. A1).

Tabelle A1: Effekte der Coadministration von GW9662 in der Negativkontrolle.

Parameter		Negativkontrolle + GW9662
AR		
P _{enh} -Index	Mch 6	1,2 \pm 0,1
	Mch 12	1,3 \pm 0,2
	Mch 25	2,0 \pm 0,4
	Mch 50	2,3 \pm 0,5
PC ₂₀₀ P _{enh} (mg Mch/ml)		24,5 \pm 3,5
BAL		
ZZ \times 10 ³ /ml	Gesamt	39,0 \pm 1,3
	Monozyten	38,4 \pm 2,6
	Lymphozyten	0,3 \pm 0,2
	Eosinophile	0
IL-5 (pg/ml)		22,6 \pm 7,1

n = 4

9.2 Detektion von *trans*-C18:1 in der Leber nach 39-tägiger CLA-Mix-Diät

Die Detektion der *trans*-Isomeren der C18:1 sollte klären, ob der ermittelte Wert für die Konzentration der C18:1c9 in den Lebern der Tiere der CLA-Mix-Diätgruppe durch eine Peaküberlagerung verfälscht worden sein könnte. Dazu wurde eine zusätzliche GC-Analyse durchgeführt. Aufgrund des geringen SEM der Fettsäurenverteilung innerhalb der Gruppen (erste GC-Analyse) wurde nur jeweils eine Probe gemessen. Die Trennung der FSME erfolgte im GC 17a V3 (3.11.2.4) unter Verwendung einer hochpolaren Kapillarsäule (CP Select, 200 m × 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke; Varian, Darmstadt, D). Die GC-Konditionen waren wie folgt: Trägergas H₂, lineare Geschwindigkeit 27,6 cm/s, Injektionsmodus Split 1:20, Injektortemperatur 260 °C, Temperaturprogramm: 50 min isotherm bei 181 °C, Anstieg um 25 °C/min auf 250 °C, 20 min isotherm bei 250 °C, Detektortemperatur 270 °C. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisator und die Auswertung mithilfe der Software GC Solution Version 2.3 (Shimadzu). Die Berechnung der prozentualen Anteile der *trans*-C18:1 bezogen auf die Gesamt-FSME übernahm dankenswerterweise Herr Peter Möckel (Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena).

Es konnte keine Erhöhung der *trans*-Isomeren der C18:1 in den Leberlipiden nach CLA-Mix-Diät festgestellt werden (Tab. A2, Abb. A1).

Tabelle A2: C18:1*trans*-Isomeren in der Leber nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten

C18:1 <i>trans</i> -Isomere	Kontrolldiät	c9,t11-CLA-reiches TAG	CLA-Mix TAG
	Anteil an den Gesamt-FSME (%)		
t4	0	0	0
t5	0,01	0	0
t6/7	0,09	0,01	0,01
t9	0,16	0,13	0,09
t10	0,10	0,02	0,03
t11	0,05	0,03	0,01
t12	0,03	0	0
t13	0	0	0
t15	0	0	0
t16	0,02	0,01	0,01

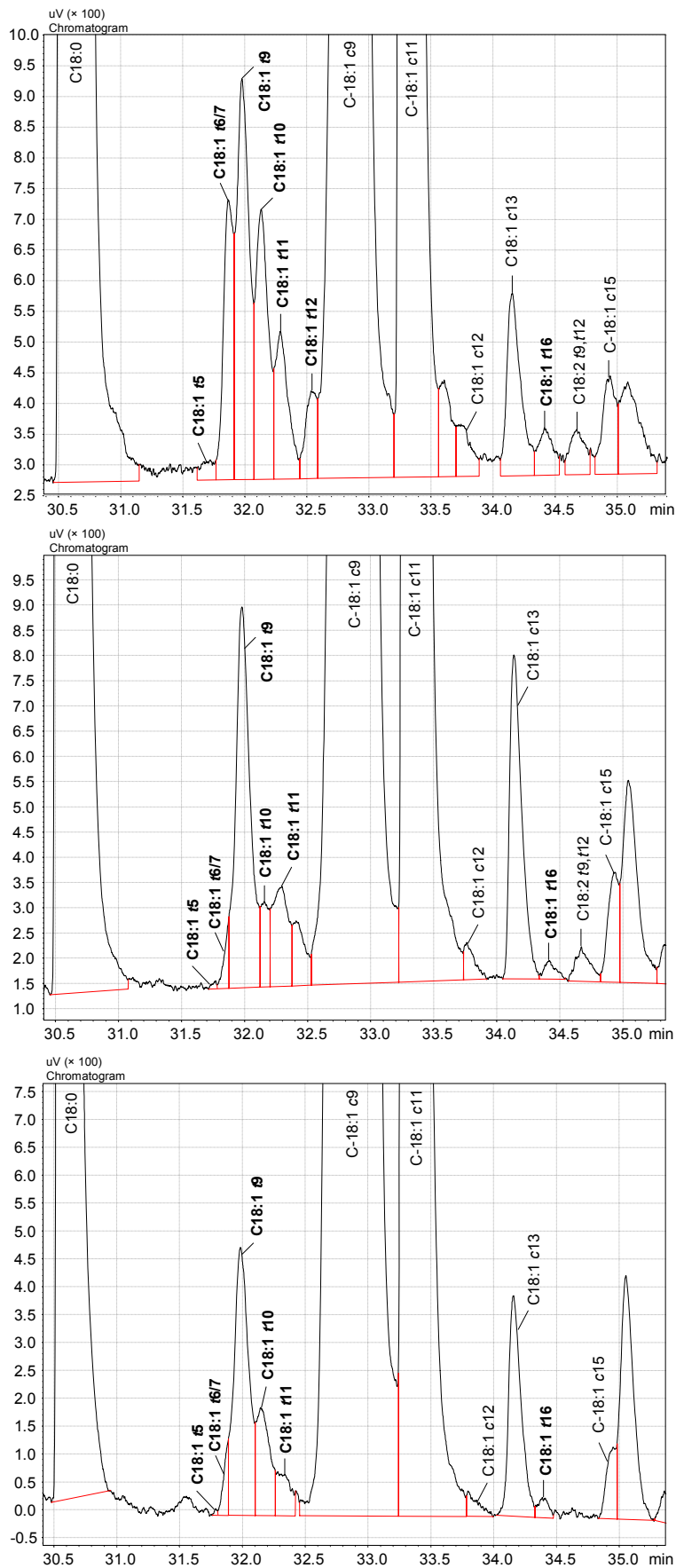


Abb. A1: Peakflächen der C18:1*trans*-Isomeren in der murinen Leber nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten. GC-Chromatogramme.

9.3 Analyse der Phospholipide des abdominalen Fettgewebes

Es sollte geprüft werden, ob der ermittelte Wert für die Konzentration der C20:4n6 im abdominalen Fettgewebe der Tiere der CLA-Mix-Diätgruppe durch eine Konzentrationsverschiebung zugunsten der Phospholipide aufgrund der reduzierten Gesamtlipide zustande kam. Dazu wurde die Fettsäurenverteilung in der Phospholipidfraktion mit der in den Gesamtlipiden verglichen.

Nach CLA-Mix-Diät war die Phospholipidfraktion des abdominalen Fettgewebes im Gegensatz zu den Gesamtlipiden in ihrem Fettsäurenmuster nicht verschieden von der Kontrolle (Abb. A2; einbezogen wurden Fettsäuren, deren Anteil an den Gesamt-FSME > 0,5 % war).

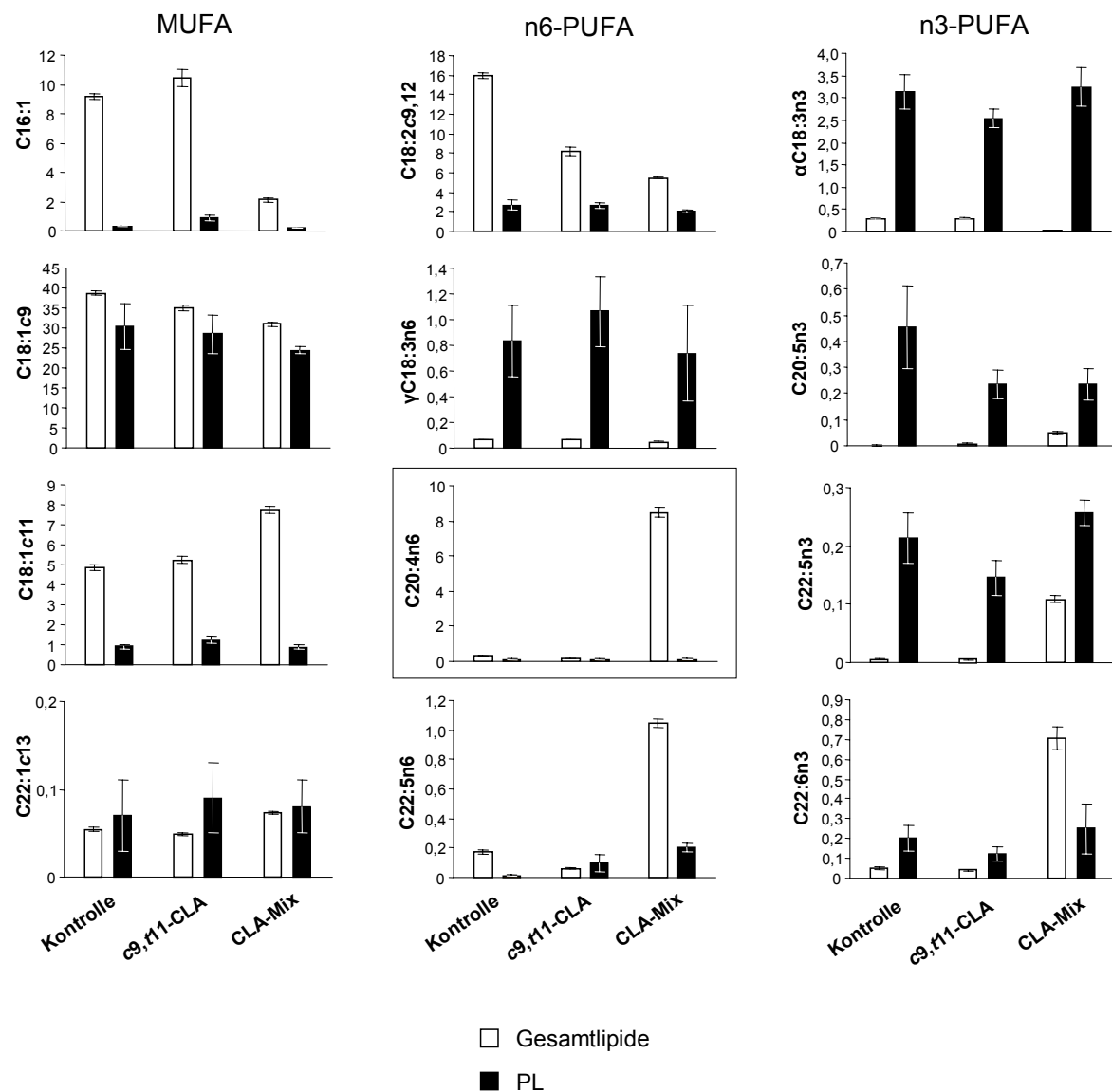


Abb. A2: Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide und der Phospholipide des abdominalen Fettgewebes nach 39-tägiger Fütterung von verschiedenen CLA-Diäten; n = 6. PL = Phospholipide

9.4 Inkorporation von *c9,t11*-CLA in BEAS-2B nach 24 h

Der Einbau von *c9,t11*-CLA (C18:2*c9,t11*) in die Zellmembran wurde nach 24-stündiger Inkubation der BEAS-2B mit 10 µg/ml der FFS bestimmt. Dazu wurde die Membran nach einer Methode von Burton *et al.* (1981) isoliert und die wie unter 3.11.2 beschrieben derivatisierten Fettsäuren der Phospholipide gaschromatographisch analysiert.

Nach 24 h wurde *c9,t11*-CLA in einer Konzentration von $17,1 \pm 2,4$ mg/100g Gesamt-FSME in der Zellmembran detektiert (Abb. A3).

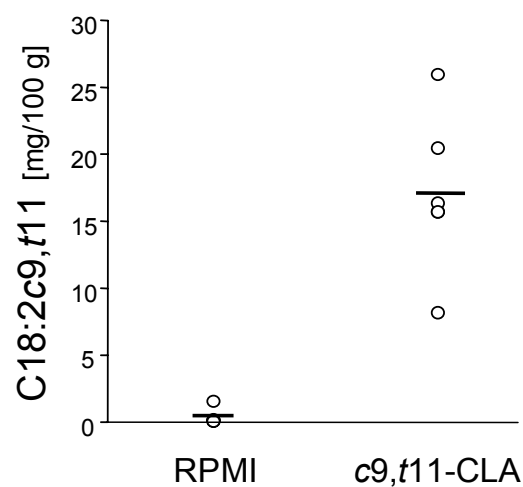


Abb. A3: Konzentration von *c9,t11*-CLA (C18:2*c9,t11*) in BEAS-2B nach 24 h Inkubation mit 10 µg/ml der FFS; n = 6.

9.5 Detektion von *t7,c9*- und *t8,c10*-CLA im *c9,t11*-CLA-Peak

Die prozentualen Anteile von *t7,c9*- und *t8,c10*-CLA in den Matrices wurden mittels Ag⁺-HPLC-Analyse bestimmt. Aufgrund des geringen SEM in der Fettsäurenverteilung innerhalb der Gruppen (GC-Analyse) wurde nur jeweils eine Probe gemessen.

Die Trennung der CLA-FSME erfolgte in einer LC-10 HPLC (Shimadzu). Die Säulenparameter, HPLC-Konditionen und Referenzsubstanzen sind ausführlich in Kraft *et al.* (2003) beschrieben.

9.5.1 Supplementiertes Öl: *c9,t11*-CLA-reiches Triazylglyzerol

Mit einem Anteil von < 1 bis 1,7 % der Gesamt-CLA in allen Matrices (Tab. A3, Abb. A4) und 0,67 % (Öl), 0,15 % (abdominales Fettgewebe), 0,02 % (Leber) und 0,03 % (Erythrozyten) der Gesamt-FSME entsprächen 1,02 % (Öl), 2,32 % (abdominales Fettgewebe), 1,1 % (Leber) und 2,26 % (Erythrozyten) des *c9,t11*-CLA-Peaks maskierter Fläche (GC-Analyse). Der prozentuale Anteil von *c9,t11*-CLA müsste also im Öl um 0,67 %-Punkte, im abdominalen Fettgewebe um 0,15 %-Punkte, in der Leber um 0,02 %-Punkte und in den Erythrozyten um 0,03 %-Punkte nach unten korrigiert werden. Somit könnten *t7,c9*- und *t8,c10*-CLA in den Matrices als vernachlässigbar angesehen werden.

Tabelle A3: Verteilung der CLA-Isomeren im *c9,t11*-CLA-reichen TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer *c9,t11*-CLA-reichen Diät.

CLA-Isomere	Öl	Abdom. Fett	Leber	Erythrozyten
	Flächen-% der Gesamt-CLA			
<i>t13,t15</i>	0	0	0	0
<i>t12,t14</i>	0	0,05	0,05	0
<i>t11,t13</i>	0,01	0,26	0,18	0,11
<i>t10,t12</i>	0,03	1,93	0,94	0,15
<i>t9,t11</i>	1,47	3,20	1,82	1,90
<i>t8,t10</i>	0,09	0,55	0,27	0,09
<i>t7,t9</i>	0,02	0,11	0,10	0,18
<i>t6,t8</i>	0	0,11	0,17	0
<i>13,15 ?</i>	0	0	0	0
<i>12,14 ?</i>	0	0	0	0,08
<i>t11,c13</i>	0	0	0,08	0
<i>c11,t13</i>	0,39	0,48	1,70	1,70
<i>t10,c12</i>	0,15	0,67	0,42	0,03
<i>c9,t11</i>	74,89	73,55	65,91	70,36
<i>t8,c10</i>	0,62	0,64	0,76	0,96
<i>t7,c9</i>	0,15	1,07	0	0,55
<i>t6,c8</i>	0	0,02	0,20	0
<i>c11,c13</i>	0	0,21	0,84	0
<i>c10,c12</i>	0,09	0,04	0,08	0
<i>c9,c11</i>	22,08	16,72	23,76	21,57
<i>c8,c10</i>	0,00	0,40	0,35	2,31

c9,t11-CLA-reiches Triacylglycerol

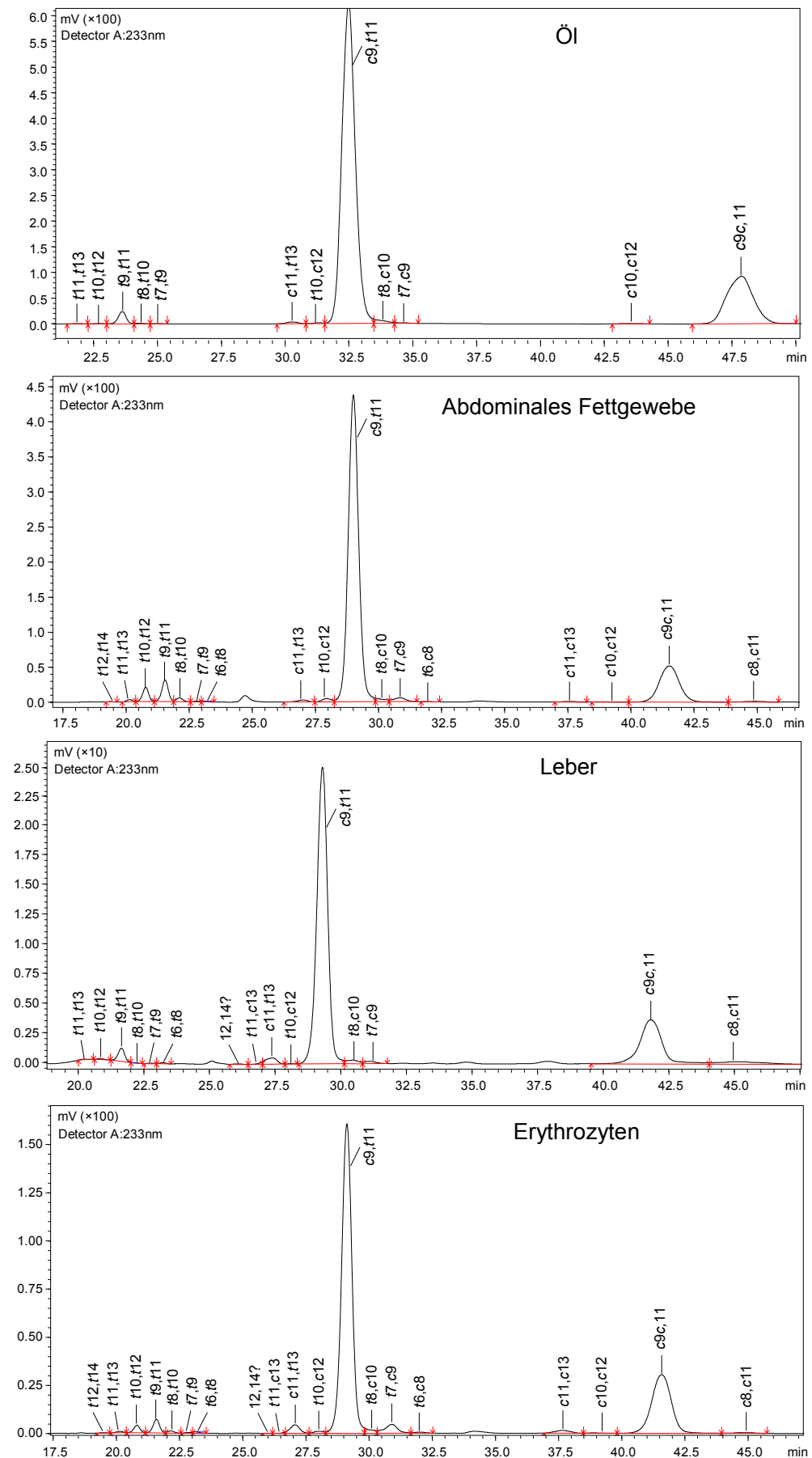


Abb. A4: Peakflächen der CLA-Isomeren im *c9,t11*-CLA-reichen TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer *c9,t11*-CLA-reichen Diät. HPLC-Chromatogramme.

9.5.2 Supplementiertes Öl: CLA-Mix Triazylglyzerol

Der Anteil von *t7,c9*- und *t8,c10*-CLA an den Gesamt-FSME (GC-Analyse) würde 0,59 % (Öl), 0,13 % (abdominales Fettgewebe), 0,06 % (Leber) und 0,09 % (Erythrozyten) und entsprechend 1,46 % (Öl), 10,65 % (abdominales Fettgewebe), 13,22 % (Leber) und 9,87 % (Erythrozyten) maskierte Fläche im *c9,t11*-CLA-Peak betragen. Somit müsste der prozentuale Anteil von *c9,t11*-CLA an den Gesamt-FSME (GC-Analyse) um 0,6 %-Punkte (Öl), 0,13 %-Punkte (abdominales Fettgewebe), 0,06 %-Punkte (Leber) bzw. 0,09 %-Punkte (Erythrozyten) nach unten korrigiert werden.

Tabelle A4: Verteilung der CLA-Isomeren im CLA-Mix TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer CLA-Mix-reichen Diät.

CLA-Isomere	Öl	Abdom. Fett	Leber	Erythrozyten
	Flächen-% der Gesamt-CLA			
<i>t13,t15</i>	0	0	0	0
<i>t12,t14</i>	0	0,08	0,07	0,06
<i>t11,t13</i>	0	0,12	0,25	0,13
<i>t10,t12</i>	0,47	0,85	1,63	1,19
<i>t9,t11</i>	0,36	0,96	1,92	1,18
<i>t8,t10</i>	0,01	0,21	0,58	0,26
<i>t7,t9</i>	0	0,32	0,45	0,30
<i>t6,t8</i>	0	0	0,03	0
<i>13,15 ?</i>	0	0	0	0
<i>12,14 ?</i>	0	0,26	0,16	0,28
<i>t11,c13</i>	0	1,56	0,25	1,07
<i>c11,t13</i>	0	5,89	5,36	2,93
<i>t10,c12</i>	45,0	38,55	10,60	36,49
<i>c9,t11</i>	52,6	43,05	51,08	38,78
<i>t8,c10</i>	0,63	4,22	1,78	4,14
<i>t7,c9</i>	0,13	0,74	6,48	0,55
<i>t6,c8</i>	0	0,12	0,97	0,34
<i>c11,c13</i>	0	0	0	0
<i>c10,c12</i>	0,44	0,47	0,29	0,39
<i>c9,c11</i>	0,33	2,31	17,49	10,74
<i>c8,c10</i>	0	0,28	0,61	1,17

CLA-Mix Triazylglyzerol

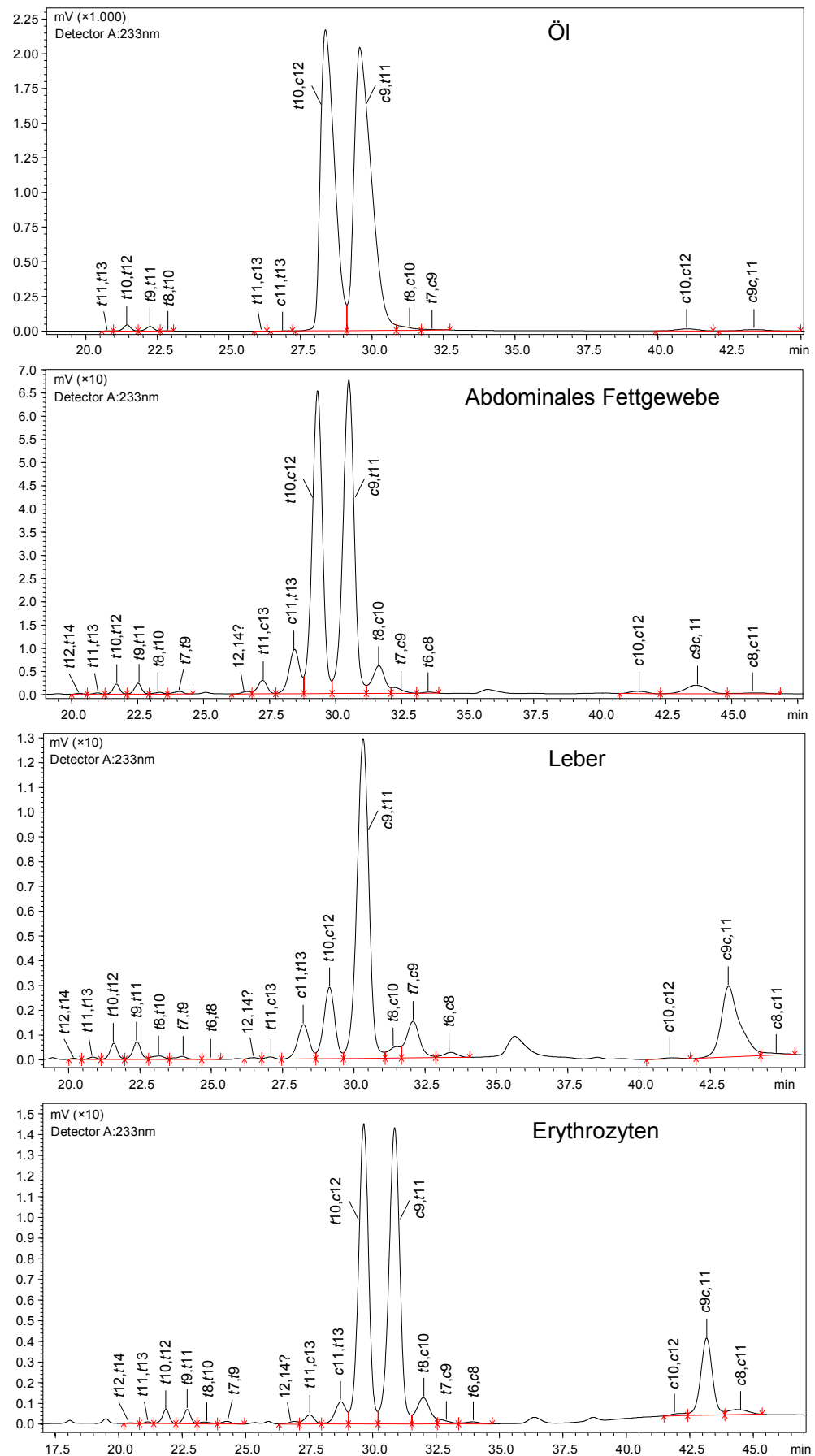


Abb. A5: Peakflächen der CLA-Isomeren im CLA-Mix TAG und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer CLA-Mix-reichen Diät. HPLC-Chromatogramme.

9.6 Fettsäurenverteilung nach olivenöldreicher Diät

Nach 39-tägiger Diät einer olivenölsupplementierten Diät (1 % C18:1c9 der Diät, w/w) wurden die Fettsäurenspektren von lipogenen und Lipidspeicherorganen gaschromatographisch analysiert (Tab. A5).

Tabelle A5: Fettsäurenverteilung im Olivenöl und in Geweben/Organen nach 39-tägiger Fütterung einer olivenöldreichen Diät.

Fettsäure	Matrix	Öl	Abdominales Fettgewebe	Leber	Erythrozyten
SFA					
C14:0		0	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C16:0		10,2	23,5 ± 0,6	26,1 ± 0,7	43,4 ± 0,7
C18:0		3,1	2,2 ± 0,1	9,5 ± 0,5	15,6 ± 0,5
<i>Rest SFA</i>		< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 2,0
MUFA					
C16:1		0,6	9,4 ± 0,1	5,0 ± 0,2	1,4 ± 0,1
C18:1c9		76,1	44,5 ± 0,2	37,2 ± 0,8	24,4 ± 0,7
C18:1c11		1,7	4,9 ± 0,1	10,8 ± 0,2	5,8 ± 0,3
C20:1c11		0,3	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<i>Rest MUFA</i>		< 1,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5
PUFA					
C18:2(n-6), LA		6,1	9,4 ± 0,6	3,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3
γC18:3(n-6)		0	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C20:4(n-6), AA		0	< 0,5	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,3
C22:5(n-6)		0	< 0,01	< 0,01	< 0,01
αC18:3(n-3)		0,7	< 0,5	< 0,1	< 0,5
C20:5(n-3)		0	< 0,01	< 0,01	< 0,01
C22:5(n-3)		0	< 0,01	< 0,01	< 0,01
C22:6(n-3)		0	< 0,1	< 0,01	< 0,01
<i>Rest PUFA (ohne CLA)</i>		< 0,1	< 0,5	< 0,5	< 0,5
CLA					
C18:2c9,t11 (c9,t11-CLA)		0	< 0,5	< 0,1	< 0,01
C18:2t10,c12 (t10,c12-CLA)		0	< 0,01	< 0,01	< 0,01
C18:2c9,c11 (c9,c11-CLA)		0	< 0,1	< 0,1	< 0,01
C18:2t9,t11 (t9,t11-CLA)		0	< 0,01	< 0,01	< 0,01
<i>Rest CLA</i>		0	< 0,01	< 0,01	< 0,1
Unbekannt		0,6	1,8 ± 0,1	3,0 ± 0,2	2,2 ± 0,4

n = 4

9.7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen verfasst habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich diese Arbeit weder gegenwärtig noch zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule zur Begutachtung vorgelegt oder die Eröffnung eines Promotionsverfahrens an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena,

Anke Jaudszus

9.8 Danksagung

Prof. Dr. Gerhard Jahreis, danke für immerwährende Unterstützung als Vater dieser Arbeit, für das große entgegengebrachte Vertrauen und das Öffnen wichtiger Türen.

Prof. Dr. Eckard Hamelmann, danke für die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe Pädiatrische Pneumologie und Allergologie der Charité, die Motivation und die gute immunologische Schule.

Prof. Dr. Dr. Claus Kroegel, danke für (m)einen Platz im Pneumologischen Labor der KIM und für hilfreiche Kritik beim Verfassen von Manuskripten.

Peter Möckel, danke für geduldige Hilfe am GC und das Teilhabenlassen an klugen Gedanken bezüglich und jenseits der Fette.

Dr. Rainer Schubert, danke für das Licht im Statistik-Dickicht und humorvolles Mildestimmen bockiger Computer.

Dr. Katrin Kuhnt und Dr. Yasemin Darcan, danke für interessante Diskussionen rund um »fette Allergien«, für die Hilfe beim Interpretieren mancher Peaks und Kurven und für echten Rückhalt.

Christine Seib und Anzhela Avagyan, danke für zuverlässige und fürsorgliche Hilfe bei der Mäusepflege.

Annette Hartmann, Yvonne Schlenker, Dr. Martin Förster und Martin Krokowski, danke für wertvolle fachliche Unterstützung, die Lachfalten und musikalische Glanzlichter im Labor.

Viola Kohlrautz, danke für *zeitlose* gute Gespräche.

Loreen Kirchhoff, danke für Thüringen-Loyalität.

Sylvia Pittag, danke für das Bringen von großen Opfern im Dienst der Wissenschaft und für selbstloses Rückenfreihalten.

Allen meinen Arbeitskollegen am Lehrstuhl Ernährungsphysiologie, danke für die Wohlfühl-Arbeitsatmosphäre.

Zahlreichen BALB/c, danke fürs Mitmachen.

Cognis GmbH & Co. KG, Deutsche Forschungsgemeinschaft und Präventions- und

Informationsnetzwerk Allergie und Asthma (pina), danke für die materielle und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Danke, Alex, dass du mir ein starker Partner, liebevoller Freund, kritischer Ratgeber und die schönste Ablenkung vom Arbeitsalltag warst und bist.

Danke, Mam und Stephan, für alles und mehr.

9.9 Publikationen und Kongressbeiträge

PUBLIKATIONEN

Übersichten und Sammelbände

- Jaudszus A, Foerster M, Kroegel C, Wolf I, Jahreis G. Einfluss von *cis*-9,*trans*-11-konjugierter Linolsäure (CLA) und Linolsäure (LA) auf das bronchiale Atemwegsepithel. Stimulus-induzierte Epithelzell-Proliferation und Freisetzung von IL-6 und IL-8. *Dtsch Med Wochenschr* 129: 1701, 2004 und *Proc Germ Nutr Soc* 7: 33, 2005

Referierte Zeitschriften

Erstautorenschaft

- Jaudszus A, Foerster M, Kroegel C, Wolf I, Jahreis G. *Cis*-9,*trans*-11-CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: comparison to *trans*-10,*cis*-12-CLA and to linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1737: 111-8, 2005
- Jaudszus A, Krokowski M, Möckel P, Darcan Y, Avagyan A, Matricardi P, Jahreis G, Hamelmann E. *Cis*-9,*trans*-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPAR γ -related mechanism in mice. *J Nutr* 138: 1336-42, 2008

Co-Autorenschaft

- Feleszko W, Jaworska J, Rha R-D, Steinhausen S, Avagyan A, Jaudszus A, Ahrens B, Groneberg DA, Wahn U, Hamelmann E. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 37: 498-505, 2006

POSTER

- Jaudszus A, Foerster M, Kroegel C, Wolf I, Jahreis G
„Antinflammatorische Effekte von *cis*-9,*trans*-11-konjugierter Linolsäure (CLA) in sensibilisiertem humanen Bronchialepithel“
42. Wissenschaftlicher Kongress der DGE e.V., 17./18. März 2005, Universität Kiel
- Jaudszus A, Möckel P, Krokowski M, Darcan Y, Jahreis G, Hamelmann E
„C9,t11-CLA reduces allergen induced sensitization and airway inflammation via a PPARgamma dependent mechanism in a mouse model of allergic asthma“
5th EAACI-GA²LEN-Davos Meeting, Basic Immunology in Allergy and Clinical Immunology, 1.-4. Februar 2007, Davos, Schweiz
und
XXVI EAACI Congress, 9.-13. Juni 2007, Göteborg, Schweden
- Jaudszus A, Möckel P, Krokowski M, Darcan Y, Jahreis G, Hamelmann E
„Immunomodulatory effects of *c*9,*t*11-CLA on allergen induced sensitization and inflammation of the respiratory tract in an established mouse model of allergic asthma“
44. Wissenschaftlicher Kongress der DGE e.V., 7./8. März 2007, Universität Halle-Wittenberg

- Jaudszus A, Möckel P, Hamelmann E, Jahreis
„T10,c12-CLA-caused lipodystrophy is associated with profound changes of fatty acid profiles: possible link to tissue-specific alterations of fatty acid desaturation“
6th Euro Fed Lipid Congress, 7.-10. September 2008, Athen

VORTRÄGE

- „*In vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von konjugierten Linolsäuren (CLA) auf die Zytokinfreisetzung“
DGE/GDCH-Symposium „Aktuelle Fragen zu Fettsäuren“, 24. Oktober 2006, Bonn
- „C9,t11-CLA hemmt die allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung über PPARgamma-vermittelte Mechanismen im Asthma-Mausmodell“
19. Mainzer Allergie-Workshop der DGAKI, 16./17. März 2007, Mainz
- „C9,t11-CLA prevents allergic sensitization and airway inflammation via PPARgamma in a mouse model of asthma“
II. International Congress on Conjugated Linoleic Acid (CLA): From experimental models to human application, 19.-22. September 2007, Villasimius, Sardinien
- „Untersuchungen zur Wirkung von c9,t11-CLA auf allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung“
Deutscher Allergie-Kongress, 26.-29. September 2007, Lübeck

9.10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anke Magdalena Jaudszus
Geboren am: 02.03.1979 in Friedrichroda

Schulbildung

09/85-07/91 Bertha-von-Suttner-Oberschule Mechterstädt
09/91-06/97 Staatliches Gymnasium Salzmannschule Schnepfenthal
Schulabschluss: Abitur

Studium

09/97-03/03 Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) in Jena
Abschluss: Dipl.-Troph.
07/99-08/99 Praktikum in der »Klinik am Rennsteig«, Fachklinik für Konservative Orthopädie und Innere Medizin, Tabarz
Tätigkeit: Ernährungsberatung und -schulung von Patienten mit Fettstoffwechselstörungen und Diabetes mellitus nach den Richtlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft
07/00-09/00 Laborpraktikum am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, FSU Jena
Thema: *In vitro*-Studien zum Einfluss von Eisennitrat auf DNA-Schäden in HT 29 clone 19A
10/01-03/02 Forschungsaufenthalt im Laboratoire de biologie moléculaire des plantes supérieures, Université Genève
Thema: Molekulare Aspekte der wirtsspezifischen Nodulation und Stickstoff-Fixierung in der Symbiose von Rhizobien und Leguminosen
07/02-02/03 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie
Thema: *In vitro*-Studien zur Wirkung des *cis*-9,*trans*-11-Isomeren der konjugierten Linolsäure im Vergleich zur Linolsäure auf die Proliferation und die Sezernierung der Interleukine IL-6 und IL-8 in mit LPS und Serum stimulierten humanen Bronchialepithelzellen

Universitäre Tätigkeit

03/03-12/03 Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl Ernährungsphysiologie
Tätigkeit: wissenschaftl. Mitarbeiter

Promotion

Seit 01/04 Am ernährungsphysiologischen Lehrstuhl der FSU Jena in Kooperation mit der Klinik für Innere Medizin (KIM), Abteilung Pneumologie, Universitätsklinikum der FSU Jena und der Pädiatrischen Immunologie/Allergologie der Charité Berlin
Thema: *Cis*-9,*trans*-11-konjugierte Linolsäure hemmt entzündliche Prozesse in Asthmamodellen *in vitro* und *in vivo*